

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MAYARA MOTA DE OLIVEIRA

**EFEITO DA NICOTINA NA EXPRESSÃO DE HIF-1 α ,
VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGENS CELULARES
SCC-9 E DOK**

VITÓRIA
2017

MAYARA MOTA DE OLIVEIRA

**EFEITO DA NICOTINA NA EXPRESSÃO DE HIF-1 α ,
VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGENS CELULARES
SCC-9 E DOK**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. ADRIANA
MADEIRA ÁVARES DA SILVA

VITÓRIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, ES,
Brasil)

O48e Oliveira, Mayara Mota de, 1989 -
Efeito da nicotina na expressão de HIF-1 α , VEGF-A, FIH E PHD3 em
linhagens celulares SCC-9 e DOK / Mayara Mota de Oliveira – 2017.
60 f. : il.

Orientador: Adriana Madeira Álvares da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências da Saúde.

1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Boca. 3. Hábito de Fumar.
4. Nicotina. 5. Anóxia. I. Silva, Adriana Madeira Álvares da. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

MAYARA MOTA DE OLIVEIRA

EFEITO DA NICOTINA NA EXPRESSÃO DE HIF-1 α , VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGENS CELULARES SCC-9 E DOK

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 23 de Fevereiro de 2017.

Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes
Universidade de São Paulo

VITÓRIA

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e graça para vencer esta etapa tão importante da minha vida. O mestrado é cheio de desafios, exige muito perseverança e sabedoria para absorver os ensinamentos nos momentos de dificuldade, e o amor de Deus nunca me faltou em nenhum destes momentos.

Agradeço à minha mãe Zilda Mara Mota por não medir esforços e apoio nestes dois anos. Sempre serei grata por você acreditar nos meus sonhos e ser tão orgulhosa das minhas conquistas.

Agradeço ao meu noivo Lucas Almeida por todo apoio, sem dúvida a trajetória foi bem mais fácil com você ao meu lado. Obrigada!

Agradeço à professora Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva pela orientação e apoio nesta etapa. Serei eternamente grata por todas as oportunidades e pela confiança no meu trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Fábio Daumas Nunes pela parceria, apoio e orientação. A sua gentileza e generosidade em nos acolher como um de seus alunos foi essencial para a conquista deste título.

Agradeço aos alunos e técnicos do Laboratório de Biologia de Células Tronco e Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da USP, em especial à Adriana Costa, Juvani Lago, Edna e Dr^a. Lília Rocha. Vocês foram essenciais para realização desta pesquisa.

Agradeço ao professor Dr. Roger Chammas e a aluna Mayara D'Auria Jacomassi do Laboratório de Biologia Celular do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo pelo auxílio para realização de parte desta pesquisa.

Agradeço aos amigos e parceiros de trabalho, Joaquim Gasparini, Lucas Maia e Gabriela Peterle, pela parceria e apoio em todas as etapas. Sempre fomos grandes amigos, mais hoje os tenho como irmãos. Amo vocês!

Agradeço ao mestre Renato Graciano de Paula, por toda ajuda com a estatística.

Agradeço as amigas Samira D'Almeida, Raíssa Debacker, Camila Santos, Thabata Damasceno, Paola Fernandes por todo apoio nesta jornada. Vocês são presentes de Deus na minha vida.

Agradeço a todos os companheiros de trabalho do grupo de biologia molecular humana do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS).

Agradeço a FAPES, pelo apoio financeiro dispensados para a realização da pesquisa.

RESUMO

OLIVEIRA, M.M. **EFEITO DA NICOTINA NA EXPRESSÃO DE HIF-1 α , VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGENS CELULARES SCC-9 E DOK**, 2017, 60f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo.

O carcinoma epidermoide de cavidade oral (CEC Oral) é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo, com taxas significativas de mortalidade e morbidade. Os principais fatores de risco para o CEC Oral são o tabagismo, o etilismo e o HPV. Em relação ao tabaco, este é composto por mais de 7000 substâncias entre estas a nicotina, que contribui para o processo de carcinogênese. A contribuição da nicotina para a carcinogênese está relacionada à ativação de múltiplas vias de sinalização que também regulam a progressão, o crescimento e a metástase de tumores por meio da estimulação dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). Pesquisas evidenciam que a exposição à nicotina pode mimetizar os efeitos da hipóxia e promover a regulação positiva na expressão gênica de genes relacionados à via, como HIF-1 α , VEGF-A, FIH e PHD3. Com o intuito de observar as influências da nicotina na expressão gênica de algumas proteínas da via de hipóxia em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cavidade oral (SCC-9) e de queratinócitos orais com displasia (DOK), foi realizada a análises da viabilidade celular e de expressão gênica dos genes HIF-1 α , VEGF-A, FIH e PHD3 por meio dos testes de MTS e RT-qPCR, respectivamente, sendo os cálculos e gráficos estatísticos feitos por meio do software GraphPad Prism® v.7. Foi observado que nicotina promove a proliferação celular na linhagem SCC-9 de forma dose e tempo dependente, destacando-se o tempo de 8h. O mesmo não foi observado para linhagens DOK. Em relação à expressão gênica, nicotina induz a expressão de HIF-1 α em células SCC-9 e DOK de forma dose e tempo dependente e a expressão de HIF-1 α contribui parcialmente para a expressão de VEGF-A sob indução de nicotina. Também foi observado que nicotina tem um alto potencial inibitório na expressão gênica dos genes FIH e PHD3. Sendo assim, nicotina tem um papel de regulação na via de hipóxia que contribui para adesão celular, invasão, migração e metástase, sugerindo que o hábito tabagista ou a direta exposição à nicotina pode estar relacionado com as possíveis respostas ao tratamento em pacientes com CEC Oral.

Palavras-chave: CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE ORAL.
TABAGISMO. NICOTINA. HIPÓXIA. RT-qPCR.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M.M. **EFEITO DA NICOTINA NA EXPRESSÃO DE HIF-1 α , VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGENS CELULARES SCC-9 E DOK**, 2017, 60f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo.

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is considered a public health problem worldwide, with significant mortality and morbidity rates. The main risk factors for OSCC are smoking, alcoholism and HPV. Regarding tobacco, this is composed of more than 7000 substances among these nicotine, which contributes to the process of carcinogenesis. The contribution of nicotine to carcinogenesis is related to the activation of multiple signaling pathways that also regulate the progression, growth and metastasis of tumors through the stimulation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Research has shown that exposure to nicotine may mimic the effects of hypoxia and promote positive regulation in the gene expression of pathway-related genes, such as HIF-1 α , VEGF-A, FIH and PHD3. In order to observe the influence of nicotine on the gene expression of some proteins of the hypoxia pathway in oral cavity Oral Squamous Cell Carcinoma lines (SCC-9) and oral keratinocytes with dysplasia (DOK), was been realized analysis of cell viability and gene expression of the HIF-1 α , VEGF-A, FIH and PHD3 genes by means of the MTS and RT-qPCR tests, respectively, and the calculations and statistical graphics performed by GraphPad Prism® v.7. It was observed that nicotine promotes cell proliferation in the SCC-9 line in a dose-dependent and time-dependent manner, with an 8h time. The same was not observed for DOK lines. In relation to nicotine gene expression it induces the expression of HIF-1 α in SCC-9 and DOK cells in a dose-dependent and time-dependent manner and the expression of HIF-1 α contributes, at least in part, to the expression of VEGF-A under induction of nicotine. It has also been observed that nicotine has a high inhibitory potential in the gene expression of FIH and PHD3 genes. Therefore, nicotine has a regulatory role in the hypoxia pathway that contributes to cell adhesion, invasion, migration and metastasis, suggesting that smoking or direct exposure to nicotine may be related to possible responses to treatment in patients with oral squamous cell carcinoma.

Key words: oral squamous cell carcinoma. smoking. nicotine. hypoxia. RT-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões anatômicas que compõem o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP). Fonte: Medicinanet. Disponível em www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/4493/cancer_de_cabeca_e_pescoco.htm . (Adaptada).....	13
Figura 2. Diagrama esquemático da regulação mediada pelo nAChR, ativados pela nicotina, NNN e NNK. Fonte: Singh et al., 2011.....	17
Figura 3. Estrutura molecular de HIF-1 α e HIF-1 β . Estrutura da proteína HIF1- α e os domínios presentes ao longo da sua cadeia.	19
Figura 4. Esquema de formação do Complexo HIF-1 em condições de normóxia e hipóxia.	20
Figura 5. Efeito <i>in vitro</i> da viabilidade em linhagem celular de carcinoma epidermoide de cavidade oral (SCC-9) incubadas com nicotina.	31
Figura 6. Efeito <i>in vitro</i> da viabilidade em linhagem celular de queratinócitos orais com displasia (DOK) incubadas com nicotina.	32
Figura 7. Expressão do gene HIF-1 α após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC-9	33
Figura 8. Expressão do gene VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC-9.....	33
Figura 10. Expressão do gene FIH após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC-9.	37
Figura 11. Expressão do gene PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC-9.....	38
Figura 12. Ativação de HIF-1 α e regulação promovida em FIH e PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC9.....	39
Figura 13. Expressão do gene HIF-1 α após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK.....	41
Figura 14. Expressão do gene VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK.....	42
Figura 15. Ativação de HIF-1 α e expressão de VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK.....	43
Figura 16. Expressão do gene FIH após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 17.** Expressão do gene PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK. 45
- Figura 18.** Ativação de HIF-1 α e regulação promovida em FIH e PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK..... 46

LISTA DE SIGLAS

B2M	β -2-microglobulina
CEC Oral	Carcinoma Epidermoide de Cavidade Oral
CQCT	Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco
DOK	Queratinócitos orais com Displasia
FIH	Fator Inibidor de HIF
HIF-1	Complexo Transcricional Hypoxia-Inducible Factor-1
HPV	Papiloma vírus Humano
IC	Intervalo de Confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
nAChRs	Receptor Nicotínico de Acetilcolina
NNK	4- (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-butanona
NNN	N'-nitrosonornicotina
P1GF	Fator de Crescimento Placentário
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PHDs	Prolil Hidroxilases
PMS	Pesquisa Nacional sobre Saúde
PNSN	Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SCC-9	Carcinoma epidermoide de cavidade oral
SUS	Sistema Único de Saúde
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VHL	Von Hippel-Lindau
VPF	Fator de Permeabilidade Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE ORAL	13
1.2	TABAGISMO: O PAPEL DA NICOTINA NA CARCINOGENESE	15
1.3	HIPÓXIA E ANGIOGENESE	18
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos.....	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	CULTURA CELULAR	25
3.2	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	26
3.3	EXTRAÇÃO DE RNA	27
3.4	ELETROFORESE	27
3.5	OBTENÇÃO DE cDNA	28
3.6	RT-qPCR.....	28
3.7	ESTATÍSTICA	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS SCC-9 E DOK INCUBADAS COM NICOTINA	31
4.2	PERFIL DE EXPRESSÃO DE HIF-1A, VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGEM CELULAR SCC-9	33
4.3	PERFIL DE EXPRESSÃO DE HIF-1A, VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGEM CELULAR DOK	40
5	DISCUSSÃO	47
5.1	VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS SCC-9 E DOK INCUBADAS COM NICOTINA	47
5.2	PERFIL DE EXPRESSÃO DE HIF-1A, VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGENS CELULARES SCC-9 E DOK	49
6	CONCLUSÃO	54
7	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE ORAL

O carcinoma epidermoide de cavidade oral (CEC oral) faz parte do conjunto de entidades nosológicas pertencente ao carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, e constitui-se pelas regiões da mucosa oral, gengiva e alvéolos superiores, gengiva e alvéolos inferiores, palato duro, língua e assoalho da boca (Figura 1) (UICC, 2009). Entre as variantes neoplásicas, o carcinoma epidermoide é o tipo de neoplasia mais observado e esta frequentemente localizado na língua (INCA, 2016).

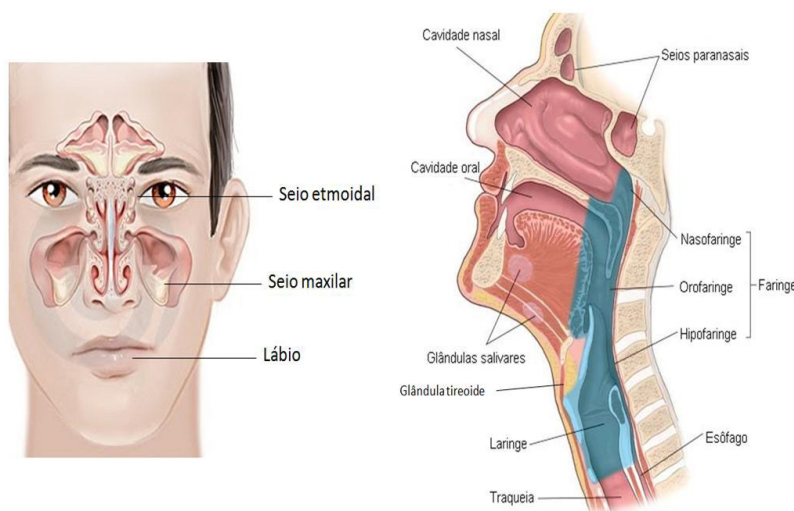


Figura 1. Regiões anatômicas que compõem o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP).
Fonte: Medicinanet. Disponível em www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/4493/cancer_de_cabeca_e_pescoco.htm. (Adaptada).

O CEC oral é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo, sendo classificado como o sexto câncer mais incidente, com estimativas de 300 mil novos casos e 145 mil óbitos decorrentes da doença no mundo para o ano de 2012 (INCA, 2016). No Brasil, estimou-se aproximadamente 15.490 mil novos casos de CEC oral para o ano de 2016, com taxas de 11.140 para o sexo masculino e 4.350 para o

sexo feminino, o que torna este carcinoma o quarto mais frequente para homens (14,58 por 100 mil habitantes) e o décimo para mulheres (5,29 por 100 mil habitantes) na região sudeste (INCA, 2016).

O CEC oral ocorre principalmente em indivíduos com idade superior a 40 anos e do sexo masculino, no entanto, nos últimos anos houve um aumento na incidência entre mulheres, o que reflete as mudanças nos hábitos tabagistas e etilistas destas (VILAR; MARTINS, 2012; INCA, 2016). Esta neoplasia também se caracteriza por apresentar prognósticos ruins, baixos índices de sobrevida e têm na cirurgia e na radioterapia as principais modalidades terapêuticas iniciais (ALVARENGA et al., 2008; CHEDID; FRANZI, 2008).

A etiologia do CEC oral baseia-se em multifatores, na qual a genética, o ambiente e os hábitos de vida do paciente são determinísticos para surgimento da neoplasia maligna. Entre os principais fatores de risco para o CEC oral, estão: o tabagismo, o etilismo, as infecções por Papilomavírus Humano (HPV), deficiências nutricionais e fatores ocupacionais (ALVARENGA et al., 2008; CURADO; HASHIBE, 2009; VILAR; MARTINS, 2012).

Estudos apontam que o tabagismo e o etilismo atuam em sinergia no desenvolvimento de lesões multifocais na cavidade oral, e esta hipótese baseia-se na atuação do álcool como solvente para as 7000 substâncias tóxicas presentes no tabaco, que em sua maioria são classificadas como carcinogênicas. Indivíduos tabagistas potencializam de 5 a 25 vezes o risco de desenvolver o tumor, sendo este correlacionado com a exposição ao tabaco, com o número de cigarros fumados por dia e com a frequência de ingestão de bebidas alcoólicas (SINGH et al., 2011; FRESQUEZ et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014).

1.2 TABAGISMO: O PAPEL DA NICOTINA NA CARCINOGENESE

A OMS estima em torno de um bilhão de usuários de tabaco em todo o mundo, e estes em sua maioria vivem em países de baixa e média renda, com uma alta incidência de doenças e mortes relacionadas ao tabagismo (OMS, 2010). Diante dos altos índices, no ano de 2003 foi criado o primeiro tratado internacional de saúde pública nomeado de Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco (CQCT), negociado sob a coordenação da Organização Mundial de Saúde e já adotado por 178 países, que visa proteger as gerações presentes e futuras das devastadoras consequências sanitárias, sociais, ambientais e econômicas geradas pelo consumo e pela exposição à fumaça do tabaco (INCA, 2017).

No Brasil as medidas de controle do tabagismo integram a Política Nacional de Controle do Tabaco, sob responsabilidade do Ministério da Saúde e com a participação de outros grupos que integram o Sistema Único de Saúde (SUS), e tem os objetivos, princípios, obrigações e medidas norteadas pela CQCT (INCA, 2017). Neste contexto, as várias ações desenvolvidas pela Política Nacional de Controle do Tabaco mostram que o percentual de adultos fumantes no Brasil vem apresentando uma expressiva queda no decorrer das últimas décadas. No ano de 1989, a Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (PNSN) estimou que 34,8% da população acima de 18 anos era fumante. A última pesquisa realizada no ano de 2013, pela Pesquisa Nacional sobre Saúde (PMS), estimou que 14,7% da população acima de 18 anos era fumante (CONICQ, 2016).

A OMS aponta o tabagismo como à principal causa de câncer evitável, sendo atribuídos 30% da fração dos principais fatores de risco para câncer (INCA, 2016). Pesquisas relacionam o tabagismo e à ocorrência de câncer no pulmão, no trato urinário, no estômago, no intestino, no fígado, no rim, no colo do útero e útero, na mama, na cavidade oral, na faringe, na laringe e esôfago, e no pâncreas (VINEIS et al., 2004; SINGH et al., 2011).

Entre as substâncias que compõem o cigarro, a nicotina é o principal composto responsável pelo processo de dependência e que contribui largamente para a

carcinogênese (CARLISLE et al., 2007; BARR et al., 2007). A nicotina é um composto dibásico que pode ser absorvido através do epitélio do pulmão, da mucosa bucal e nasal, do intestino, da pele, e a sua absorção está correlacionada ao pH alcalino. Uma pessoa que fuma aproximadamente 25 cigarros/dia irá absorver aproximadamente 0,43 mg de nicotina/kg de peso corporal e obter uma concentração de nicotina no sangue no intervalo de 4-72 ng/ml (SANNER; GRIMSRUD, 2015).

Em relação à mucosa bucal, estudos indicam que os níveis de nicotina na saliva é aproximadamente oito vezes mais elevado que o encontrado no plasma (ROSE et al., 1993; ADRIAN et al., 2006). Este aumento pode estar correlacionado a adição de compostos nos cigarros, como o hidróxido de cálcio, que aumentam a alcalinidade da região bucal, e levam a um aumento da absorção a partir da cavidade oral (MISHRA et al., 2015).

A contribuição da nicotina para a carcinogênese está relacionada à ativação de múltiplas vias de sinalização que também regulam a progressão, o crescimento e a metástase de tumores por meio da estimulação dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). Os nAChRs são estruturas pentaméricas, que atuam como alvo do tipo canal iônico, compostas por cinco subunidades (α (alfa), β (beta), γ (gama), δ (delta) e ϵ (epsolon)) que possuem estruturas semelhantes. Sabe-se que existem 09 tipos de subunidades α , 04 tipos de subunidade β , e 01 tipo de subunidade γ e δ (CARLISLE et al., 2007).

O receptor $\alpha 7$ AChR, é um dos subtipos do nAChRs altamente expresso em tumores, e é associado com o crescimento e migração de células tumorais, e nos processos de angiogênese e apoptose. Várias linhas de pesquisa sugerem que a regulação promovida pela nicotina esteja diretamente relacionada com a estimulação específica deste receptor, no entanto, os mecanismos moleculares subjacentes ao seu papel na progressão do câncer ainda são pouco conhecidos (SINGH et al., 2011; WARREN; SINGH, 2013; MA et al., 2014).

A carcinogênese correlacionada com a absorção de nicotina também é promovida pela sua nitrosação e formação dos derivados 4- (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-butanona (NNK) e N'-nitrosonornicotina (NNN). Estes compostos também estimulam

os nAChRs e contribuem com os processos inflamatórios que ocorrem na cavidade oral em resposta ao tabagismo (Figura 2) (WEST et al., 2003; SANNER; GRIMSRUD, 2015; MISHRA et al., 2015).

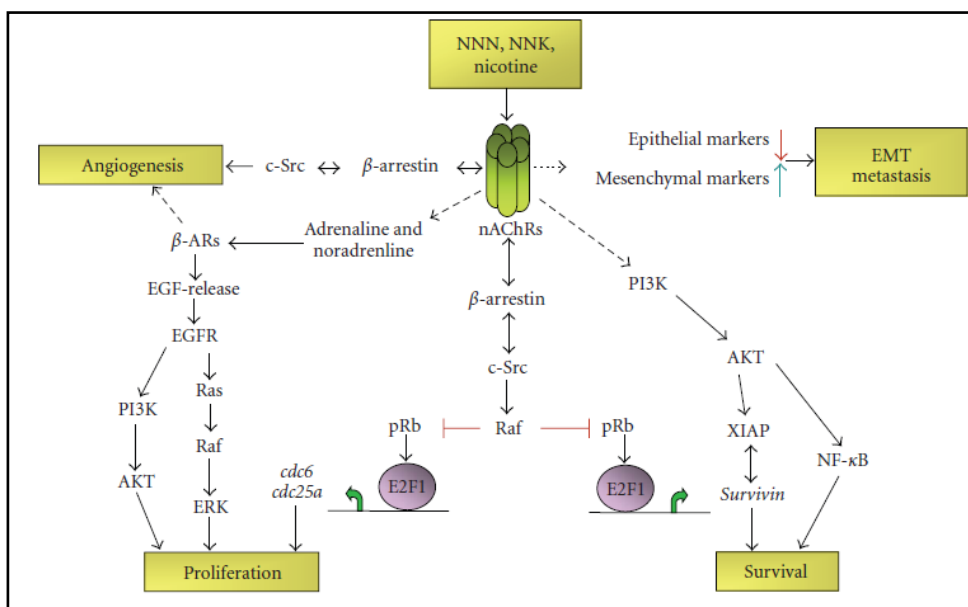


Figura 2. Diagrama esquemático da regulação mediada pelo nAChR, ativados pela nicotina, NNN e NNK. Fonte: Singh et al., 2011.

Algumas pesquisas indicam que a ativação dos nAChRs pela nicotina está relacionada como a ativação de proteínas-quinases a jusante, que podem mediar o processo de resistência à quimioterapia. Estudos indicam que os pacientes diagnosticados com câncer e que permanecem fumando durante o tratamento tem um pior prognóstico, devido ao aumento da toxicidade, baixa eficácia das drogas terapêuticas na quimioterapia e redução das respostas à radioterapia, e todos estes contribuem para um maior risco de complicações durante o tratamento (CHEN et al., 2011; PINTO et al., 2011; MISHRA et al., 2015).

Os estudos que visam estabelecer uma correlação entre nicotina e a progressão tumoral são mais evidentes em cânceres que acometem o aparelho respiratório, nestes foram demonstrados que os efeitos mediados pela nicotina se assemelham à regulação celular promovida pelas células em hipóxia (SANNER; GRIMSRUD, 2015). Pesquisas evidenciaram que a exposição à nicotina pode mimetizar os

efeitos da hipóxia e promover a regulação positiva na expressão gênica de genes relacionados à via, como HIF1 α , VEGF, FIH e PHD3 (ZHANG et al., 2007; GUO et al., 2012; Shi et al., 2012). Embora estes estudos tenham reportado que a nicotina estimula a regulação de várias vias relacionadas à progressão tumoral, em especial na expressão de genes relacionados com a via de hipóxia, os mecanismos subjacentes permanecem pouco compreendidos (MA et al., 2014).

1.3 HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE

Os mecanismos de controle da homeostase do oxigênio são essenciais para a sobrevivência das células, logo, as concentrações de O₂ devem ser rigidamente controladas para manutenção da fisiologia e bioquímica celular (CHINTALA et al., 2012), e o complexo *transcricional hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) desempenha um papel central na homeostase e na regulação das respostas celulares e sistêmicas à hipóxia (SEMENZA, 1999). HIF-1 promove a transcrição de mais de 100 genes que atuam em mecanismos específicos para aumentar o suprimento de O₂ e para evitar a morte celular, dentre esses, estão os genes relacionados à angiogênese, proliferação, adesão e metabolismo celular, metástase, e outros (ECKERT et al., 2012; CHINTALA et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

O HIF-1 é um heterodímero proteico composto por duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β , também denominadas como *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT), ambas pertencentes à família de proteínas *basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim* (bHLH-PAS). As subunidades HIF-1 α e HIF-1 β possuem padrões de expressão distintos: a subunidade HIF-1 β é constitutivamente expressa no núcleo, com níveis de mRNA e de proteína constantes na célula, independente da concentração de oxigênio. A subunidade HIF-1 α também é expressa constitutivamente, no entanto, a concentração de oxigênio atua como agente regulador por modificações pós-traducionais, como hidroxilação e ubiquitinação, que garantem que ela seja degradada pelo sistema proteossomal, o que mostra a influência da molécula de O₂

no tempo de meia vida da proteína (CARROL; ASHCROFT, 2006; SEMENZA, 2012).

A subunidade HIF-1 α possui os domínios bHLH e PAS (*Per-ARNT-Sim*), que garantem a dimerização com a subunidade HIF-1 β e a ligação ao DNA. Sua estrutura molecular também é composta por outros dois domínios localizados na porção N-terminal (N-TAD) e na C-terminal (C-TAD), os quais atuam na ativação da transcrição gênica. O domínio C-terminal (C-TAD) também atua na sinalização da subunidade HIF-1 α , quando está é translocada para o núcleo, na estabilização proteica e estabelece a interação com o coativador p300, o qual garante a transcrição dos genes envolvidos com os mecanismos específicos para evitar a morte celular por hipóxia. Tanto na porção N-terminal, como na C-terminal existe um importante domínio, o ODD (oxygen-dependent degradation), que atua na mediação da estabilidade da HIF-1 α de acordo com a disponibilidade de oxigênio (Figura 3) (SEMENZA, 2003; KAE LIN; RATCLIFFE, 2008).

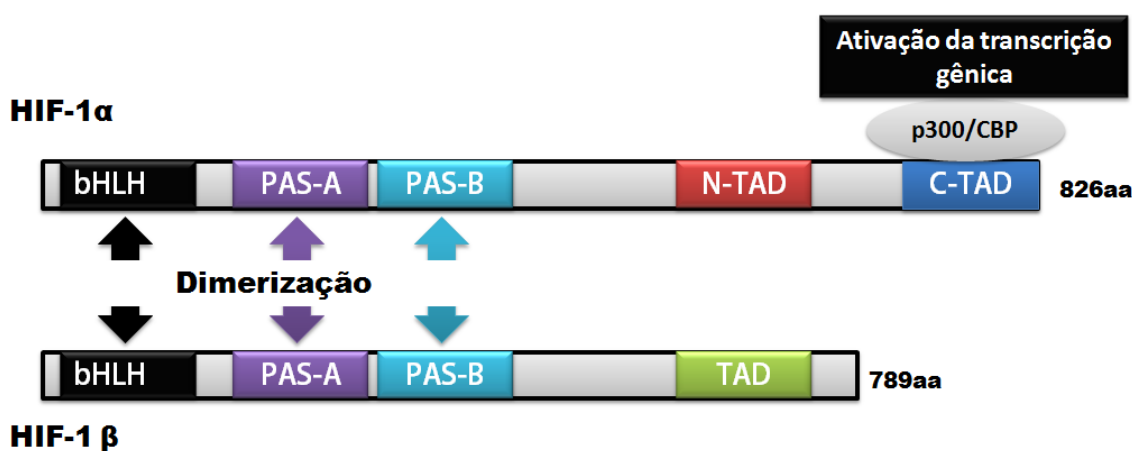


Figura 3. Estrutura molecular de HIF-1 α e HIF-1 β . Estrutura da proteína HIF1- α e os domínios presentes ao longo da sua cadeia. Os domínios bHLH e PAS da HIF-1 α mediam a dimerização com a proteína HIF-1 β . Os domínios N-TAD e C-TAD são requeridos para hidroxilação da proteína HIF-1 α e também para a ativação da transcrição gênica. A cadeia polipeptídica da subunidade HIF-1 α totaliza 826 aminoácidos. Modificado de Yong-Shi e Gang-fang in World J Gastroenterol 2004; 10(8): 1082-1087.

A abundância de subunidade HIF-1 α é regulada, primariamente, por proteínas pertencentes à família prolil hidroxilases chamadas: PHD1, PHD2 e PHD3. Células em normóxia transcrevem e sintetizam a proteína HIF-1 α constitutivamente, porém

essa é rapidamente degradada após sofrer modificação pós-traducional, como a hidroxilação do domínio ODD pelas PHDs. Essa hidroxilação é dependente de oxigênio e α -cetoglutarato como substratos e ferro e ascorbato como cofatores das reações (SEMENZA, 2003; STOLZE et al., 2006; RANKIN; GIACCIA, 2008). A HIF-1 α , após hidroxilação, é reconhecida pela proteína von Hippel-Lindau (pVHL), que recruta o complexo ubiquitina ligase, e este marca a proteína HIF-1 α para a degradação proteossomal (Figura 4) (SEMENZA, 2012).

A degradação de HIF-1 α também é assegurada por outro mecanismo de regulação, realizado pelo fator inibidor de HIF (FIH), uma enzima sensível ao oxigênio. Na presença de oxigênio, o FIH promove a hidroxilação de um resíduo de asparagina, na porção C-terminal da HIF-1 α , e esta previne a interação de HIF-1 α com o seu coativador de transcrição p300/CBP (Figura 4) (HEWITSON et al., 2002; SEMENZA, 2003; RANKIN; GIACCIA, 2008).

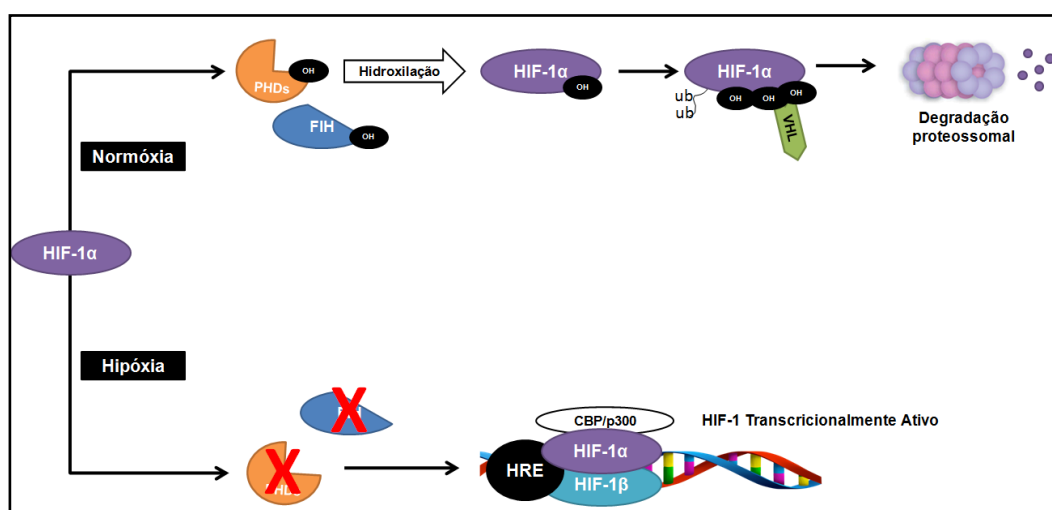


Figura 4. Esquema de formação do Complexo HIF-1 em condições de normóxia e hipóxia.

Na presença de oxigênio intracelular, as proteínas PHDs hidroxilam o domínio ODD e FIH hidroxila de um resíduo asparagina da proteína HIF-1 α , seguida a proteína pVHL reconhece a HIF-1 α hidroxilizada e a encaminha para a degradação proteossomal. Na falta de oxigênio intracelular, a HIF-1 α não é hidroxilada e isto permite a entrada de HIF-1 α no núcleo. Assim, HIF-1 α dimeriza-se com a subunidade HIF-1 β , formando o complexo HIF-1 transcricionalmente ativo. Quando formado, o heterodímero se liga ao DNA e inicia-se a transcrição de genes que favorecerão a sobrevivência da célula.

Células em hipóxia inicializam uma resposta celular anti-apoptótica, na qual a subunidade HIF-1 α estabilizada é translocada do citoplasma para o núcleo, local onde HIF-1 α dimeriza-se com a subunidade HIF-1 β , formando o complexo HIF-1 transcricionalmente ativo, que se associa com coativadores transcricionais e promove a expressão de genes associados à adaptação a hipóxia (Figura 4) (SEMENZA, 2003). A estabilidade da atividade transcricional de HIF-1 α é assegurada, em situações de hipóxia, por alguns mecanismos de regulação, como pela inativação do fator inibidor de HIF (FIH), o que permite a interação de HIF-1 α com o seu coativador de transcrição p300/CBP (SEMENZA, 2003; RANKIN; GIACCIA, 2008).

A hipóxia é encontrada em diferentes graus na maioria dos tumores sólidos, devido as características inerentes as regiões pouco vascularizadas. Células próximas à periferia do tumor são bem vascularizadas, o que garante um maior aporte de oxigênio e nutrientes. Células internalizadas caracterizam-se pela pouca vascularização, tornando-as anóxicas e necróticas. As células que intermedeiam estas duas regiões, em sua maioria estão hipóxicas, devido às alterações estruturais ou quantitativas dos vasos, e isto reflete em uma baixa oxigenação. Assim, o sistema de resposta celular às condições de hipóxia é essencial para a progressão de tumores sólidos (OLIVEIRA; ALVES, 2002; BUSTAMANTE et al., 2009).

Células que sobrevivem ao estresse hipóxico adquirem resistência a diversas alterações fisiológicas e não fisiológicas, incluindo radioterapia e quimioterapia. Pacientes tratados com radioterapia tendem à produção de espécies reativas de oxigênio, como: os radicais superóxido (O_2^-), os radicais hidroperoxila (HO_2^-) e radical hidroxila (OH^-), que atuam na degradação de moléculas essenciais (BUSTAMANTE et al., 2009). Neste contexto, células em hipóxia formam uma quantidade reduzida de espécies reativas de oxigênio, exigindo de 2,5 a 3 vezes a dose de radiação para produzirem o mesmo nível de apoptose do que células óxicas, o que caracteriza uma alta resistência e baixa eficiência à radioterapia (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos genes expressos em resposta a hipóxia, e está relacionado à angiogênese, ao aumento da permeabilidade dos vasos, crescimento, proliferação e migração de células tumorais (SHI et al., 2012). O VEGF também pode ser descrito como fator de permeabilidade

vascular (VPF) ou VEGF-A, e este pertence a uma família multigênica composta por outros quatro membros: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, P1GF (fator de crescimento placentário) (CARMELIET; JAIN, 2011).

O mecanismo de sinalização do VEGF é mediado pela ligação e promoção da autofosforilação dos dois receptores de tirosina-quinase, que são: VEGF receptor-1 (VEGFR-1) e VEGF receptor-2 (VEGFR-2), sendo este último também chamado de receptor de cinases contendo domínio receptor (KDR). Os receptores VEGFR constituem-se de uma porção extracelular com 7 domínios do tipo imunoglobulina, uma única região transmembranar, e uma porção intracelular que contém o domínio tirosina-quinase (CARDOSO et al., 2016).

Os estímulos promovidos pelo VEGF resultam em respostas celulares nas células endoteliais de ponta (*tip cells*), responsáveis pela organização do processo angiogênico, e as células endoteliais que seguem as células de ponta (*stalk cells*), e estas coordenam o processo migratório. O processo de migração das células endoteliais finaliza quando as ramificações que migram de forma oposta se encontram por meio das *tip cells*, restabelecendo o fluxo sanguíneo, a homeostase no tecido e o estado quiescente das células endoteliais (JOHNSON et al., 1999; HSU et al., 2014).

A expressão do VEGF é relacionada à progressão de doenças devido ao seu papel na regulação da microcirculação em processos patológicos. Em relação a tumorigênese, a expressão do VEGF, pode ser correlacionada com a formação de metástases, já que é necessário um maior aporte de oxigênio e nutrientes para que as células tumorais possam colonizar outros tecidos (PRADEEP et al., 2011).

Curiosamente, a mesma matriz extracelular que provê às células tumorais proteínas necessárias para a sustentação, sobrevivência e crescimento tumoral, contém diversas proteínas e fragmentos protéicos com propriedades antiangiogênicas, como angiostatina e endostatina, constituindo-se também numa barreira importante para a formação de novos tumores. As células tumorais que sobrevivem às etapas anteriores e atingem novos sítios metastáticos, são outra vez selecionadas, de acordo com seu potencial angiogênico, e novamente o VEGF é um fator essencial nesse processo, estimulando não apenas o crescimento de novos vasos, mas

também de células tumorais, que frequentemente expressam receptor para esse fator (KISHIMOTO et al., 2012).

Dentro do exposto, observa-se que hipóxia, densidade vascular reduzida e o hábito tabagista estão diretamente relacionados a um pior prognóstico dos pacientes com câncer (CHEN; COSTA, 2009; MISHRA et al., 2015), e que os mecanismos para resistência a hipóxia caracteriza-se pela modulação da expressão de vários genes que garantem a sobrevivência fenotípica e a agressividade clínica do tumor (CHINTALA et al., 2012; SEMENZA, 2012).

Sendo assim, a compreensão dos mecanismos relacionados com a progressão tumoral é essencial para o desenvolvimento de terapias anticâncer, e a elucidação da regulação gênica em resposta à hipóxia pode proporcionar uma nova visão para a compreensão de como estas células tumorais evoluem sob estresse ambiental e fornecer fundamentos para o desenvolvimento de drogas e formas de tratamento e intervenção contra o câncer (YANG et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da nicotina na expressão gênica da HIF-1 α , VEGF-A, FIH e PHD3 em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cavidade oral (SCC-9) e de queratinócitos orais com displasia (DOK), além da viabilidade celular dose e tempo- dependente.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* o efeito da nicotina sobre a viabilidade celular segundo a dose e o tempo de exposição em linhagem celular SCC-9, por meio do ensaio MTS.
- Avaliar *in vitro* o efeito da nicotina sobre a viabilidade celular segundo a dose e o tempo de exposição em linhagem celular DOK, por meio do ensaio MTS.
- Avaliar a expressão dos genes HIF1 α , VEGF-A, FIH e PHD3 por RT-qPCR em cultura de células SCC-9 submetidas a diferentes concentrações de nicotina e submetidas à câmara de hipóxia, nos tempos de 8 e 24h.
- Avaliar a expressão dos genes HIF1 α , VEGF-A, FIH e PHD3 por RT-qPCR em cultura de células DOK submetidas a diferentes concentrações de nicotina e submetidas à câmara de hipóxia, nos tempos de 8 e 24h.

3 METODOLOGIA

3.1 CULTURA CELULAR

Para análise da influência da nicotina na expressão gênica de HIF1 α , VEGF-A, FIH E PHD3 em células tumorais de carcinoma epidermoide de cavidade oral (linhagem comercial SCC-9), e de queratinócitos orais com displasia (linhagem comercial DOK), adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC® CRL1629™), as linhagens foram cultivadas no Laboratório de Biologia de Células Tronco (LABITRON) da Faculdade de Odontologia da USP. A linhagem SCC-9 foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle's® (DEMEm, Gibco, Germany) associado ao meio Ham F12 e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução antibiótica-antimicótica e 1% de Hidrocortisona. A linhagem DOK foi cultivada somente em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução antibiótica-antimicótica e 1% de Hidrocortisona.

O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido e o meio de cultura trocado a cada dois dias. Ao atingirem confluência de 70%, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com 3 mL de PBS 1X pH 7,2 estéril e dispostas em 2mL de tripsina a 0,05% durante 5 minutos na estufa para destacá-las da placa de cultura. Após alguns minutos de exposição, adicionou-se 2mL de meio de cultura para inativação da enzima. As células em suspensão foram centrifugadas a temperatura ambiente a 1300rpm por 4 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado, o precipitado de células foi ressuspensionado em 3mL de meio de cultura. Alíquotas de 1×10^5 células foram distribuídas em placas de petri e mantidas na estufa até atingirem aproximadamente 80% de confluência sendo então utilizadas para os experimentos de extração de RNA.

Para os estudos conduzidos sob condições de normóxia, as células foram cultivadas em 20% de O₂ e 5% de CO₂. Os estudos conduzidos para condições responsiva à hipóxia foram realizados no Laboratório de Biologia Celular do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP-FMUSP), e as células foram cultivadas em 94% de nitrogênio, 5% de CO₂ e 1% de O₂.

3.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Para a análise de viabilidade celular 8x10³ células foram cultivadas em placas para cultura de células com 96 poços, e decorrido o tempo de ligação nas placas as células foram expostas a diferentes concentrações de nicotina (Nicotine ≥99% - Sigma) (0 mM, 0.1 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM e 30 mM), por tempos variados (8 e 24h). Passado o tempo de exposição, a viabilidade celular foi analisada por meio do método colorimétrico baseado na biorredução do composto MTS (Promega® #G3580).

A absorbância foi lida em leitor de microplacas (ELx800™, Bio-Tek Instruments, Winooski) no comprimento de 490 nm usando como grupos de controles negativos células não expostas a nicotina. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados analisados por meio de análise de variância one-way (ANOVA) e teste Dunnett (p<0.05) utilizando o software GraphPad® v.7.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA).

Após a identificação da dosagem máxima de nicotina que garantisse a viabilidade celular, foram estabelecidos as concentrações de nicotina (0.1 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM e 10 mM), nos tempos de 8 e 24h. Para a análise da influência da nicotina na expressão dos genes relacionados com a via responsiva de hipóxia as células

também foram submetidas à câmara de hipóxia, permanecendo na mesma durante os tempos já descritos.

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA

Para a extração de RNA das culturas celulares, o meio de cultura foi aspirado das placas e estas foram incubadas com 1,5 mL de TRIzol por 5 minutos. Após a lise celular, as células foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno livres de RNase e DNase e em cada amostra foi adicionado 0,3 mL de clorofórmio. Os tubos foram centrifugados a 10.200 rpm durante 15 min à 4°C, e em sequência a fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para tubos estéreis. Nos tubos foi adicionado 0,75 mL de álcool isopropílico por mililitro de solução desnaturante e os mesmos foram centrifugados a 10.200 rpm durante 10 min à 4°C. Neste momento foi possível observar a formação do precipitado de RNA no fundo do tubo.

Por fim, a solução sobrenadante foi descartada, e foi adicionado 1 mL de álcool a 75% gelado e os tubos foram centrifugados a 8.400 rpm durante 5 min. O álcool foi descartado e o RNA foi ressuspenso em água livre de DNase e RNase.

A concentração do RNA foi determinada no aparelho Nanodrop® no comprimento de onda de 260 e 280 nm e armazenado a -80°C até o momento de sua utilização.

3.4 ELETROFORESE

Para análise da integridade do RNA, 1 µg de cada amostra foi misturado com 5x tampão de aplicação (solução aquosa de 30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol), e submetido ao aquecimento durante 10 min a 70°C e separados por eletroforese em gel de agarose a 1% por 1 h a 60V.

3.5 OBTENÇÃO DE cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o equivalente a 1 µg de RNA de cada amostra pelo kit *High Capacity cDNA RT* (Life Technologies™). Para cada reação utilizou-se 10µL do Mix (10x RT Buffer, dNTP Mix, RT Rodom Primer, RNase Inibitor, Multiscribe™ Reverse Transcriptase, água DNase free) adicionados em cada amostra. A síntese foi realizada no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient®) sob as condições de 25°C por 10 min, 37°C por 2 hora e a 85°C por 5 minutos.

3.6 RT-qPCR

As reações de RT-qPCR, para análise de expressão gênica das culturas celulares expostas a diferentes concentrações de nicotina, foram realizadas utilizando-se o termociclador 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), no Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Odontologia da USP.

Os produtos da transcrição reversa serviram de molde para a amplificação por RT-qPCR, sendo todas as reações realizadas em um volume final de 10 µL, em placas óticas, com os seguintes reagentes: x µL dos *primers* forward e reverse para cada um dos genes em estudo e para a β-2-microglobulina (controle endógeno da reação), 5 µL Syber Green Master Mix® (Applied Biosystems), o equivalente a 1 µg de cDNA e água ultra pura para completar o volume. Para cada par de *primers* foi realizada RT-qPCR utilizando-se água estéril (blank), para avaliação de sua possível contaminação.

O processo de ciclagem térmica foi padronizado para cada um dos genes estudados, e após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, conferindo-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação. Os *primers* utilizados no estudo foram desenhados por meio do programa de bioinformática PrimerQuest (<https://www.idtdna.com/Primerquest>), evitando-se polimorfismos de nucleotídeos únicos dentro dos primeiros locais de ligação e nos transcritos semelhantes. Todos tiveram a homologia analisada por meio do *Blast* (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência do *primers* utilizados no RT-qPCR

Gene	Primer
<i>HIF-1α</i>	Forward: 5'-TTCAAGCAGTAGGAATTGGAAC-3' Reverse: 5'-CGTTTCCAAGAAAGTGATGTAGTAG-3'
<i>VEGF-A</i>	Forward: 5'- AGGGCAGAATCATCACGAAG-3' Reverse: 5'-GTCTCGATTGGATGGCAGTAG-3'
<i>PHD3</i>	Forward: 5'-GCTTCCTCCTGTCCCTCAT-3' Reverse: 5'-AAGCCACCATTCGCTTAGAC-3'
<i>FIH</i>	Forward: 5'-CTACCCATACCCTGTTCAT-3' Reverse: 5'-AATTAGGGAACCTCTCGTAG-3'
<i>β-2-microglobulina</i>	Forward: 5'-TGCTATGTGTCTGGGTTTC-3' Reverse: 5'-CAAGTCTGAATGCTCCACT -3'

Para análise quantitativa da expressão nas culturas celulares foi usado o método Ct comparativo (método $2^{-\Delta\Delta CT}$), e os dados foram normalizados com o gene endógeno padrão (β -2-microglobulina) e calculados como a variação relativa nos níveis de expressão em relação ao grupo calibrador (Células submetidas à câmara de hipóxia) (LIVAK; SCHMITTGEN 2001).

3.7 ESTATÍSTICA

Para a análise estatística e avaliação da relação entre os padrões de expressão gênica das amostras de culturas de células submetidas a diferentes concentrações de nicotina, por tempos variados, foi utilizando a análise de variância one-way (ANOVA), seguida de teste tukey. Todos os cálculos e modelos estatísticos foram calculados com a utilização do software GraphPad Prism® v.7, considerando a relação significativa quando o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS SCC-9 E DOK INCUBADAS COM NICOTINA

A viabilidade das linhagens celulares SCC-9 e DOK incubadas com concentrações crescentes de nicotina foram analisadas por meio do ensaio de MTS, e os resultados são apresentados nas figuras 5 e 6. Observa-se diferença significativa na viabilidade das células SCC-9 incubadas nas concentrações de 1 mM e 2,5 mM no tempo de 8 horas (figura 5A), também se pode observar uma grande redução na viabilidade na concentração de 30 mM, e esta pode ser ocasionada por alcançar o limiar de toxicidade celular devido a incubação em uma alta concentração de nicotina. A figura 5B mostra uma alteração no padrão de viabilidade celular para o tempo de 24h, observando-se uma redução significativa ($p < 0,0001$) na viabilidade das células expostas a concentrações de 20 mM e 30 mM.

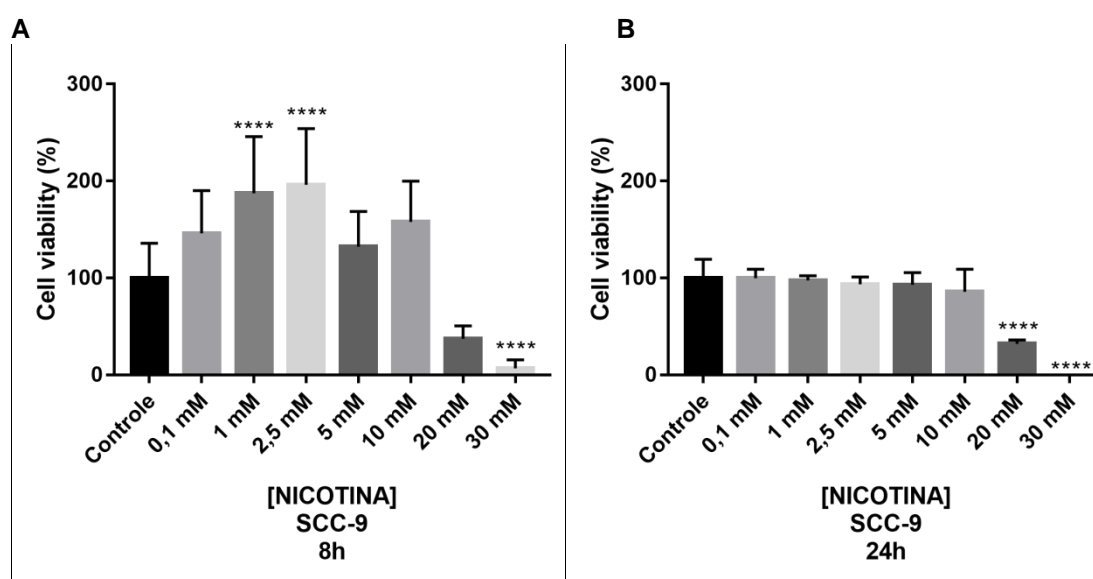


Figura 5. Efeito *in vitro* da viabilidade em linhagem celular de carcinoma epidermoide de cavidade oral (SCC-9) incubadas com nicotina. (A) Análise da viabilidade inferida através do ensaio de MTS após incubação com nicotina por 8h. **** As concentrações de 1 mM, 2,5 mM e 30

mM diferem significativamente ($p<0,01$) do controle (Células que não foram incubadas com nicotina). **(B)** Análise da viabilidade inferida através do ensaio de MTS após incubação com nicotina por 24h. **** As concentrações de 20 mM e 30 mM diferem significativamente ($p<0,0001$) do controle (Células que não foram incubadas com nicotina). Os dados são representativos de três experimentos independentes analisados através de teste *Dunnett*, e as reações foram preparadas em triplicatas, sendo os valores expressos como média \pm desvio padrão.

As análises realizadas na linhagem celular DOK não mostram diferença significativa na viabilidade das células incubadas nas concentrações de 0,1 a 30 mM no tempo de 8 horas (figura 6A), no entanto, este padrão sofre uma alteração no tempo de 24h, observando-se uma redução significativa da viabilidade celular nos tempos de 2,5 mM, 10 mM, 20 mM e 30 mM em relação ao controle (figura 6B).

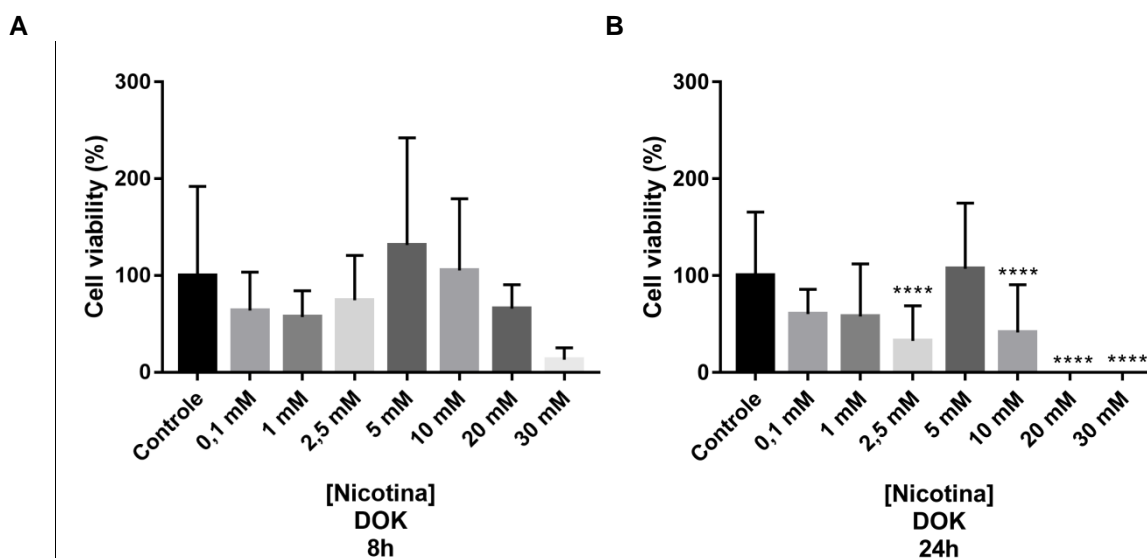


Figura 6. Efeito *in vitro* da viabilidade em linhagem celular de queratinócitos orais com displasia (DOK) incubadas com nicotina. (A) Análise da viabilidade inferida através do ensaio de MTS após incubação com nicotina por 8h e (B) por 24h. **** No tempo de 24h as concentrações 2,5 mM e 10 mM diferem significativamente ($p<0,05$) do controle (Células que não foram incubadas com nicotina). As concentrações de 20 mM e 30 mM também diferem significativamente ($p<0,0001$) do controle. Os dados são representativos de três experimentos independentes analisados através de teste *Dunnett*, e as reações foram preparadas em triplicatas, sendo os valores expressos como média \pm desvio padrão.

Diante destes resultados, foram escolhidas as concentrações de 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM e 10 mM para o experimento de análise de expressão gênica, uma vez que estas foram as concentrações que se mantiveram com uma segura viabilidade em relação ao controle da reação.

4.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DE HIF-1A, VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGEM CELULAR SCC-9

Para analisar se a nicotina modula a expressão de genes relacionados à via de hipóxia na linhagem celular SCC-9, foi realizada a análise do nível de expressão dos genes HIF-1 α , VEGF-A, FIH e PHD3, nos tempos de exposição de 8 e 24h e sob diferentes concentrações (0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5mM, 10mM).

Como mostrado na figura 7, HIF-1 α foi diferencialmente expresso nos tempos de 8 e 24h. A exposição à nicotina induziu a expressão de HIF-1 α nas concentrações de 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5mM por 8h, e na concentração de 0,1 por 24h. Observou-se que HIF-1 α foi 5,1 vezes mais expressa na concentração de 0,1 por 24h em comparação com as células em hipóxia (figura 7B). Também pode-se observar diferenças significativas no comparativo de expressão entre as concentrações.

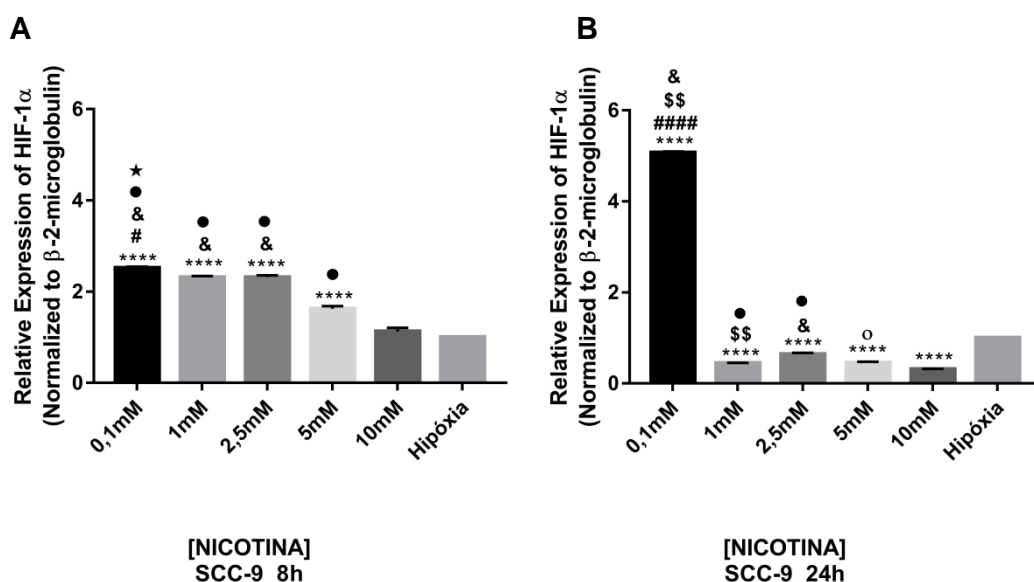


Figura 7. Expressão do gene HIF-1 α após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC-9. (A) Análise da expressão de HIF-1 α após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC9 por 8 h e (B) por 24 h. **** Diferem significativamente do grupo controle (Câmara de hipóxia) através de teste Tukey ($p < 0,0001$), • Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,0001$), ○ Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,001$), & Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,0001$), \$\$ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,0001$), ★ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,05$), ##### Diferem significativamente de 1 mM ($p < 0,0001$), # Diferem significativamente de 1 mM ($p < 0,05$). O número relativo de transcritos de HIF-1 α foi normalizado em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisado através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três

experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.

Em relação à expressão do gene VEGF-A, este teve uma maior expressão na concentração de 1 mM no tempo de 8h, observando-se uma expressão 1,5-vezes maior em comparação as células hipóxicas (figura 8A). É valido ressaltar que as concentrações de 0,1 mM e 5 mM incubadas por 8h foram igualmente expressas as células expostas a hipóxia, e as demais concentrações tiveram expressão menor do que a observada em células expostas a hipóxia.

Por outro lado, todas as concentrações no tempo de 24h apresentaram menor expressão gênica do que a observada nas células em hipóxia, destacando-se o apenas o tratamento de 0,1 mM que apresentou um aumento significativo no nível de expressão em comparação aos outros tratamentos. Foi observado um aumento de 9,2-vezes na expressão de células incubadas com 0,1 mM em comparação as células incubadas com 1 mM de nicotina (figura 8B).

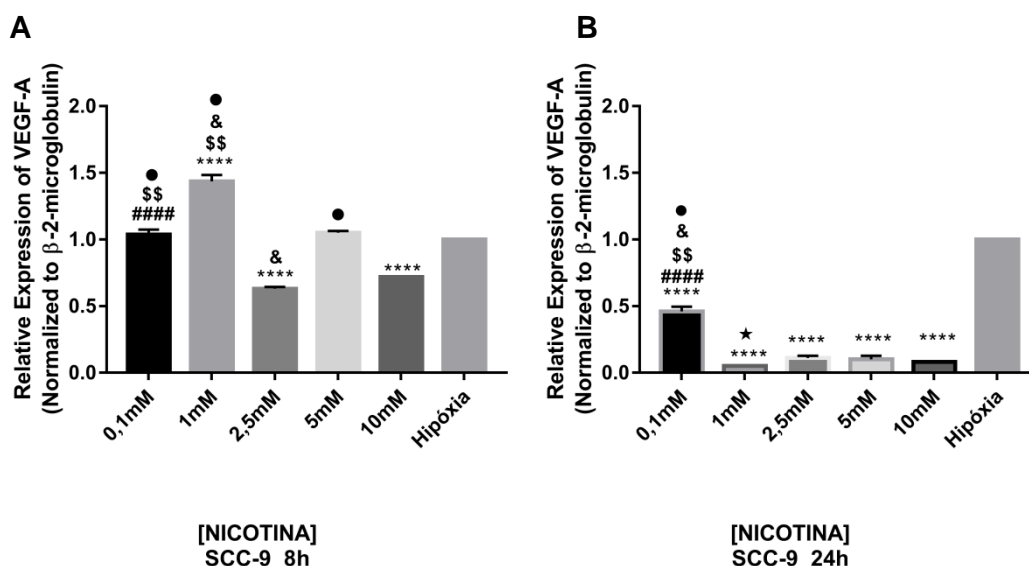
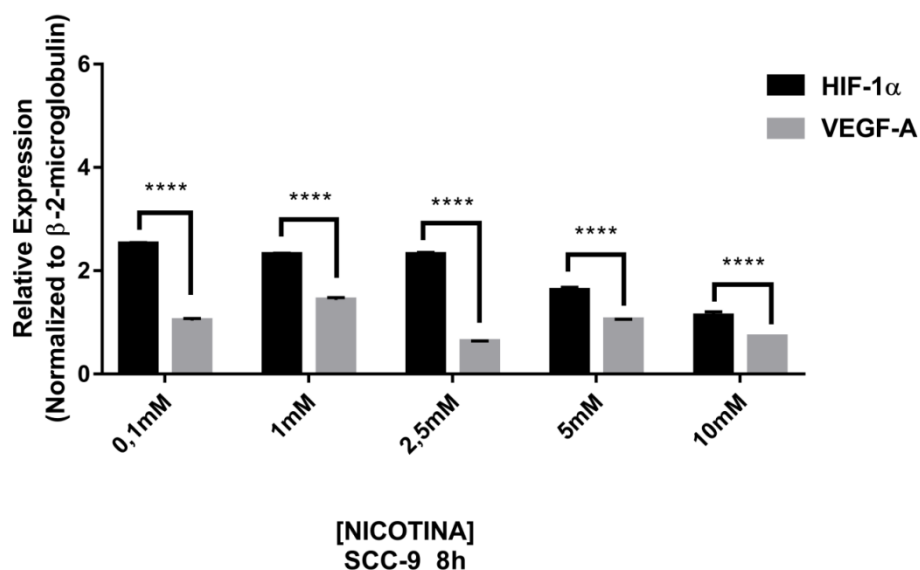


Figura 8. Expressão do gene VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC-9. (A) Análise da expressão de VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC9 por 8 h e **(B)** por 24 h. **** Diferem significativamente do grupo controle (Câmara de hipóxia) ($p < 0,0001$), • Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,0001$), & Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,0001$), \$\$ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,0001$), ##### Diferem significativamente de 1 mM ($p < 0,0001$). O número relativo de transcritos de VEGF-A foi normalizado em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisado através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.

O gene VEGF-A está entre os mais de 100 genes expressos em resposta a ativação a via da HIF-1, sendo assim, faz-se necessário identificar se HIF-1 α promove a indução da expressão gênica observada para VEGF-A em células expostas a nicotina. Pode-se observar uma forte correlação entre a expressão de HIF-1 α e VEGF-A para a linhagem SCC-9 tratadas por 8h (Figura 9A). O mesmo padrão segue para as células tratadas por 24h, na qual, a redução na expressão de HIF-1 α também afetou a expressão de VEGF-A (Figura 9B), podendo-se afirmar que a exposição a diferentes concentrações de nicotina influencia diretamente a expressão de HIF-1 α seguido da expressão do gene VEGF-A, e que o padrão de expressão observado está diretamente ligado às concentrações e ao tempo de exposição à nicotina.

A



B

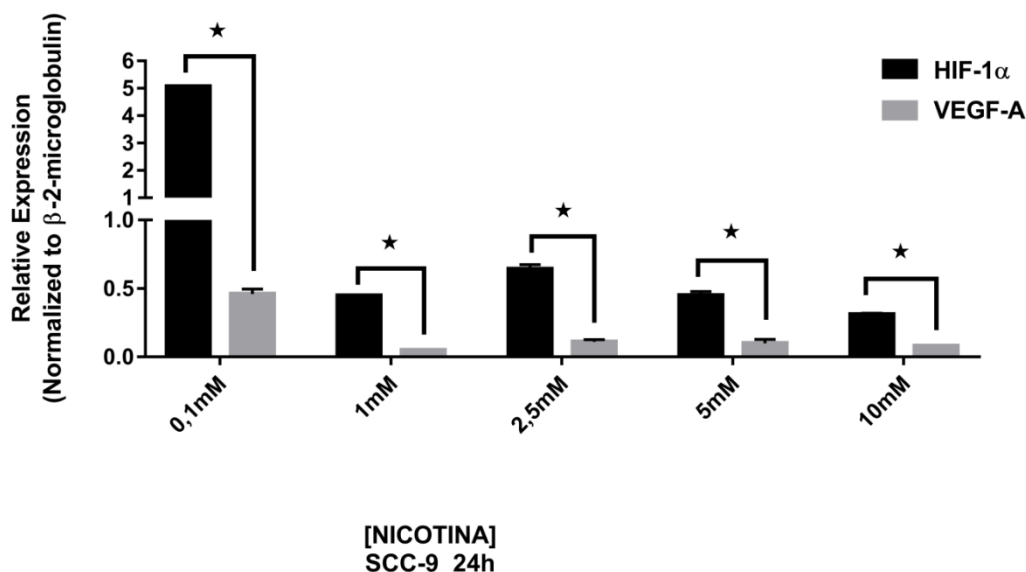


Figura 9. Ativação de HIF-1 α e expressão de VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC9. (A) Ativação de HIF-1 α e expressão de VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC9 por 8h e **(B)** por 24h. **** Após 8h de exposição, na concentração 0,1 mM VEGF-A difere significativamente de HIF-1 α ($p < 0,0001$); em 2,5 mM VEGF-A difere significativamente de HIF-1 α ($p < 0,001$); em 1 mM e 5 mM VEGF-A difere significativamente de HIF-1 α ($p < 0,01$); e em 10 mM VEGF-A difere significativamente de HIF-1 α ($p < 0,05$). ★ Após 24h de exposição, as concentrações 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM e 10 mM VEGF-A difere significativamente de HIF-1 α ($p < 0,0001$); em 5 mM VEGF-A difere significativamente de HIF-1 α ($p < 0,01$). O número relativo de transcritos dos genes HIF-1 α e VEGF-A foram normalizados em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisados através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.

FIH e PHD3 têm como papel principal a regulação da expressão de HIF-1 α por mecanismos distintos, e o perfil de expressão observado para ambos são vistos nas figuras 10 e 11. Em relação à FIH (figura 10), o padrão de expressão entre o tempo de exposição de 8 e 24h mostrou-se diferente. A análise do tempo de 8h mostrou que apenas o tratamento 1 mM teve uma expressão gênica equivalente a observada nas células em hipóxia, e os demais tratamentos apresentaram menor expressão quando comparados a hipóxia e a 0,1mM (figura 10A). As células incubadas por 24h com nicotina obtiveram um aumento de 1,9-vezes na expressão do gene no tratamento de 0,1 mM em comparação a células em hipóxia (figura 10B). Este tratamento também apresentou um valor de expressão 16,8-vezes maior quando comparado ao tratamento 5 mM/24h.

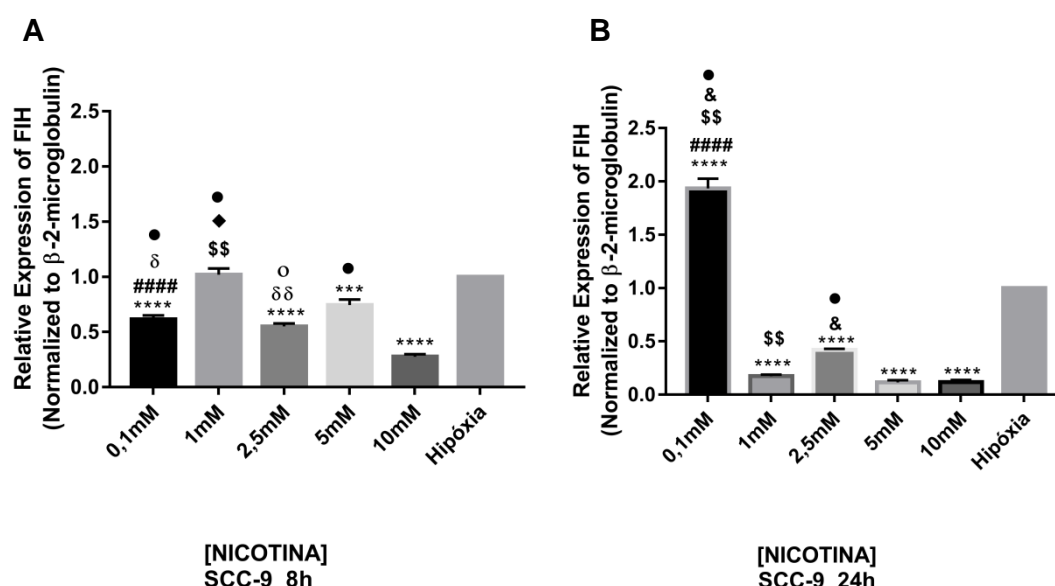


Figura 10. Expressão do gene FIH após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC-9. (A) Análise da expressão de FIH após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC9 por 8 h e (B) por 24 h. **** Diferem significativamente do grupo controle (Câmara de hipóxia) ($p < 0,0001$), *** Diferem significativamente do grupo controle ($p < 0,001$), • Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,0001$), ○ Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,001$), & Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,0001$), ♦ Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,001$), δδ Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,01$), δ Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,05$), \$\$ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,0001$), ##### Diferem significativamente de 1 mM ($p < 0,0001$). O número relativo de transcritos de FIH foi normalizado em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisado através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.

A análise do perfil de expressão de PHD3 (figura 11) mostrou que todos os tratamentos tiveram menor expressão quando comparados as células em hipóxia, e

não houve diferença significativa entre os tratamentos incubados por 8h e 24h (figura 11A e B).

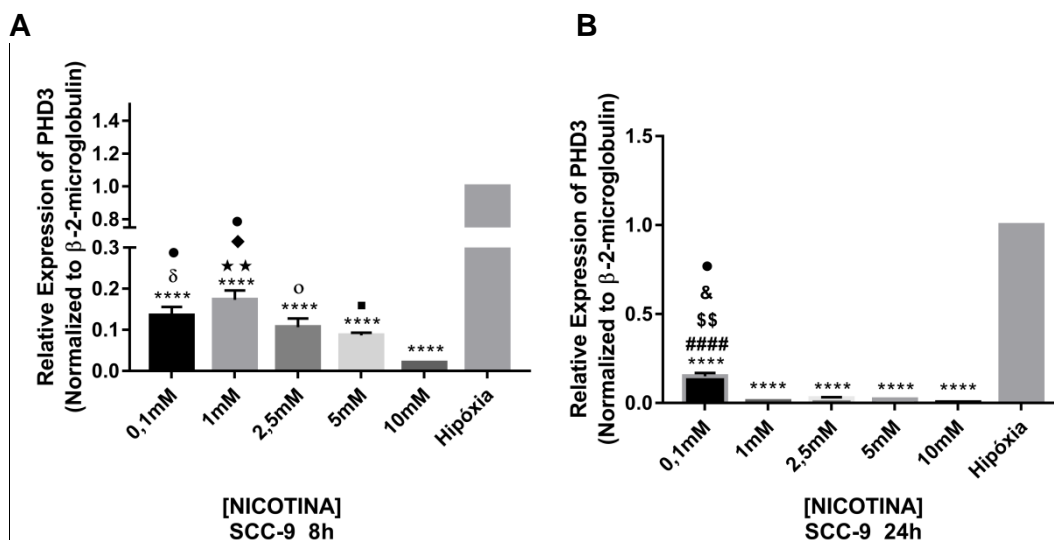


Figura 11. Expressão do gene PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC-9. (A) Análise da expressão de PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC9 por 8 h e (B) por 24 h. **** Diferem significativamente do grupo controle (Câmara de hipóxia) ($p < 0,0001$), • Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,0001$), ○ Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,001$), & Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,0001$), ♦ Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,001$), δ Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,05$), \$\$\$ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,0001$), ★★ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,01$), ##### Diferem significativamente de 1 mM ($p < 0,0001$). O número relativo de transcritos de PHD3 foi normalizado em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisado através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.

Dentro do observado, o padrão de expressão para os genes de regulação da via HIF-1 seguem de forma distinta. Na figura 12, pode-se observar que a expressão dos genes FIH e PHD3 possui uma alta correlação com a expressão do gene HIF-1 α , observando-se uma maior expressão de FIH, sendo assim, pode-se afirmar que para a linhagem SCC-9 FIH é mais expresso que PHD3, podendo ser o gene correlacionado com a regulação gênica de HIF-1 α sob exposição à nicotina.

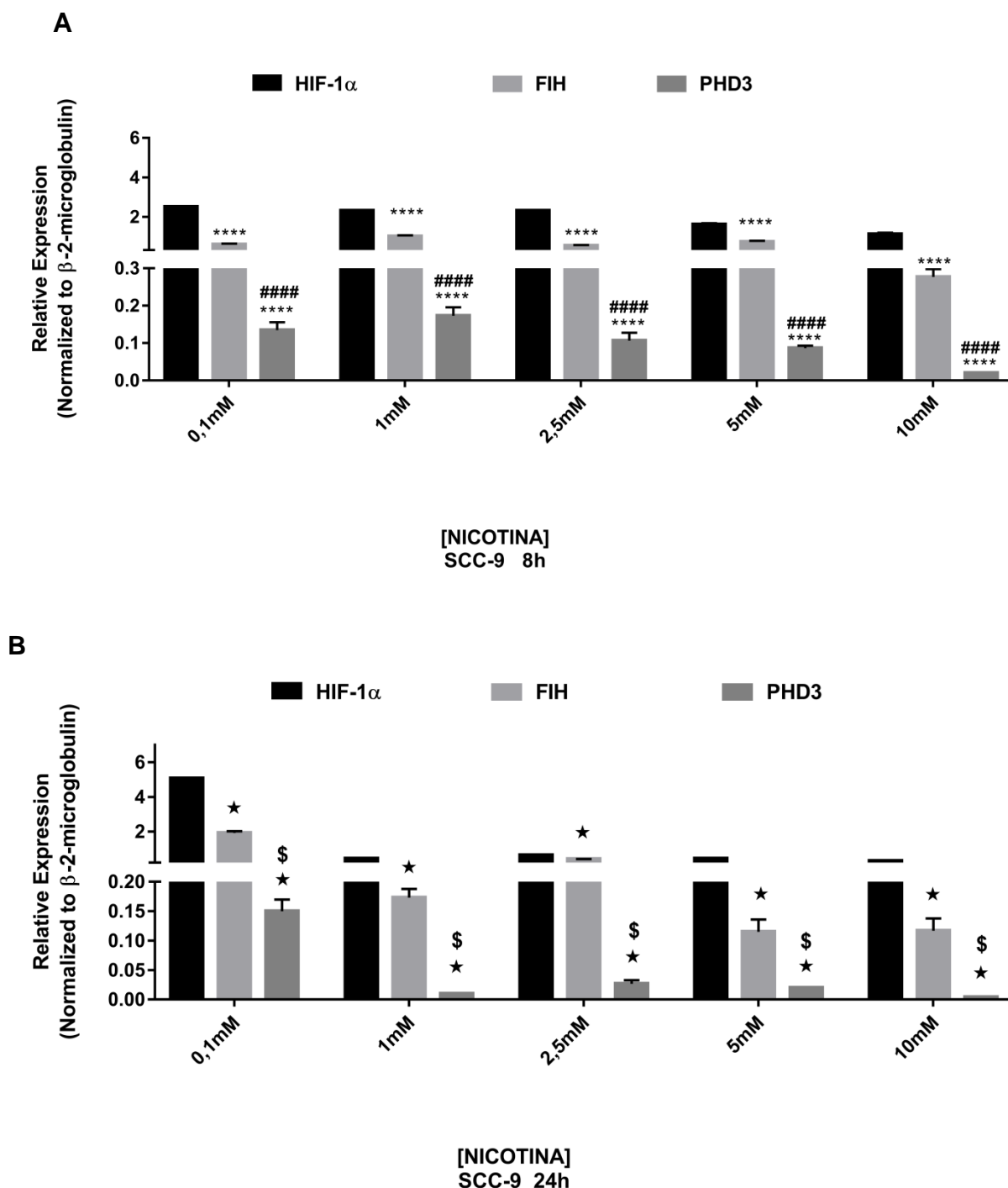


Figura 12. Ativação de HIF-1 α e regulação promovida em FIH e PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC9. (A) Ativação de HIF-1 α e regulação promovida em FIH e PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC9 por 8h e (B) por 24h. ** Após 8h de exposição às concentrações 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM e 10 mM diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,0001$). ##### às concentrações 0,1 mM, 2,5 mM, 5 mM e 10 mM diferem significativamente de FIH ($p < 0,001$); e a concentração 1 mM difere significativamente de FIH ($p < 0,0001$). ★ Após 24h de exposição às concentrações 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM e 10 mM diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,0001$). \$ às concentrações 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM diferem significativamente de FIH ($p < 0,0001$); a concentração 5 mM difere significativamente de FIH ($p < 0,01$); a concentração 10 mM difere significativamente de FIH ($p < 0,001$). O número relativo de transcritos dos genes HIF-1 α , FIH E PHD3 foram normalizados em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisados através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.**

4.3 PERFIL DE EXPRESSÃO DE HIF-1A, VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGEM CELULAR DOK

Para analisar se a nicotina modula a expressão de genes relacionados à via de hipóxia, na linhagem celular DOK, foi realizada a análise do nível de expressão dos genes HIF-1 α , VEGF-A, FIH e PHD3, nos tempos de exposição de 8 e 24h e sob diferentes concentrações (0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5mM, 10mM), assim como realizado para a linhagem SCC-9.

O nível de expressão observado para o gene HIF-1 α foi diferenciado para todos os tratamentos em 8h de exposição (figura 13A). Observou-se um aumento na expressão de 1,5-vezes, 1,2-vezes, 1,4-vezes, 1,6-vezes e 1,4-vezes para os tratamentos 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5mM, 10mM, respectivamente, em comparação a linhagem exposta a hipóxia. Um padrão inverso foi visto em células expostas por 24h, na qual todos os tratamentos tiveram uma redução nos níveis de expressão em comparação com as células em hipóxia (figura 13B). Também foi possível observar uma diferença significativa na comparação entre os tempos de 8h e 24h de exposição ($p < 0,001$).

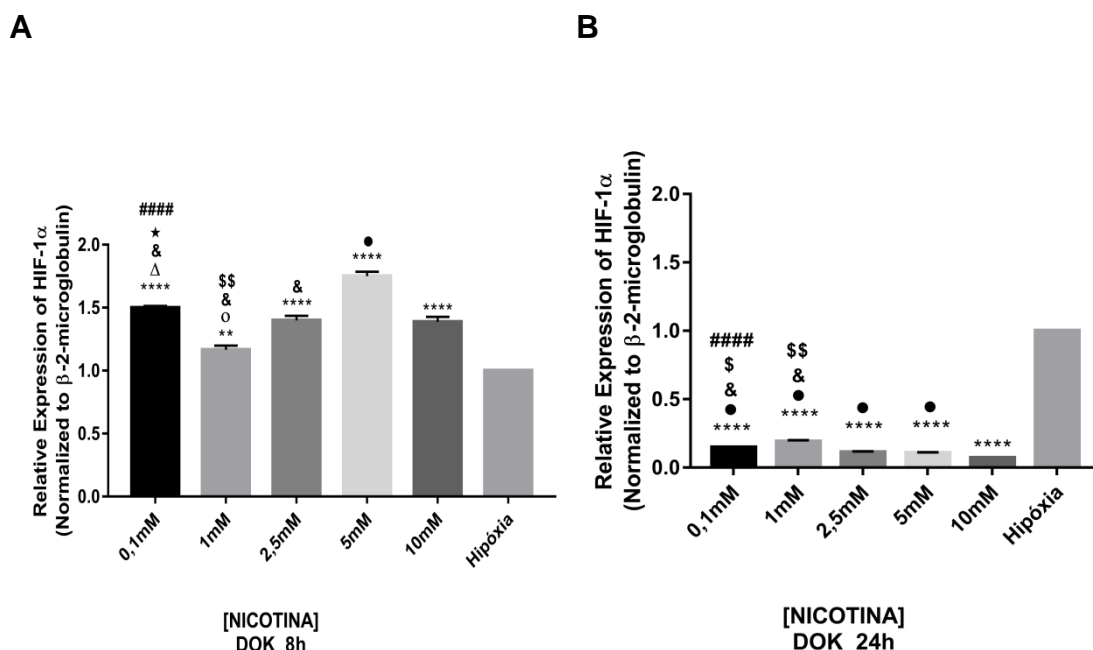


Figura 13. Expressão do gene HIF-1 α após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK. (A) Análise da expressão de HIF-1 α após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK por 8 h e (B) por 24 h. **** Diferem significativamente do grupo controle (Câmara de hipóxia) ($p < 0,0001$), ** Diferem significativamente do grupo controle ($p < 0,01$), • Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,0001$), ○ Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,05$), ★ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,05$), & Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,0001$), \$\$ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,0001$), \$ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,001$), ##### Diferem significativamente de 1 mM ($p < 0,0001$). O número relativo de transcritos de HIF-1 α foi normalizado em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisado através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.

Para o gene VEGF-A os níveis de expressão também variaram entre os tratamentos em 8h de incubação, observando-se uma expressão 1,8-vezes maior no tratamento 2,5 mM em comparação a células hipóxicas (Figura 14A). No tempo de 24h, todos os tratamentos tiveram menor expressão em comparação às células em hipóxia (Figura 14B). A comparação entre os tempos de 8h e 24h de exposição também apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$).

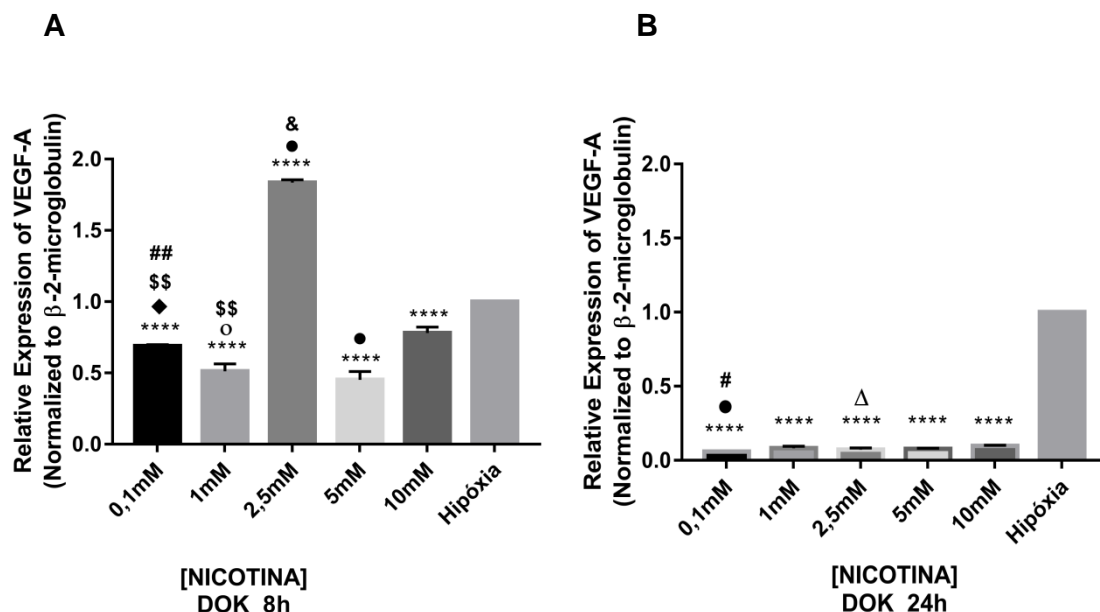
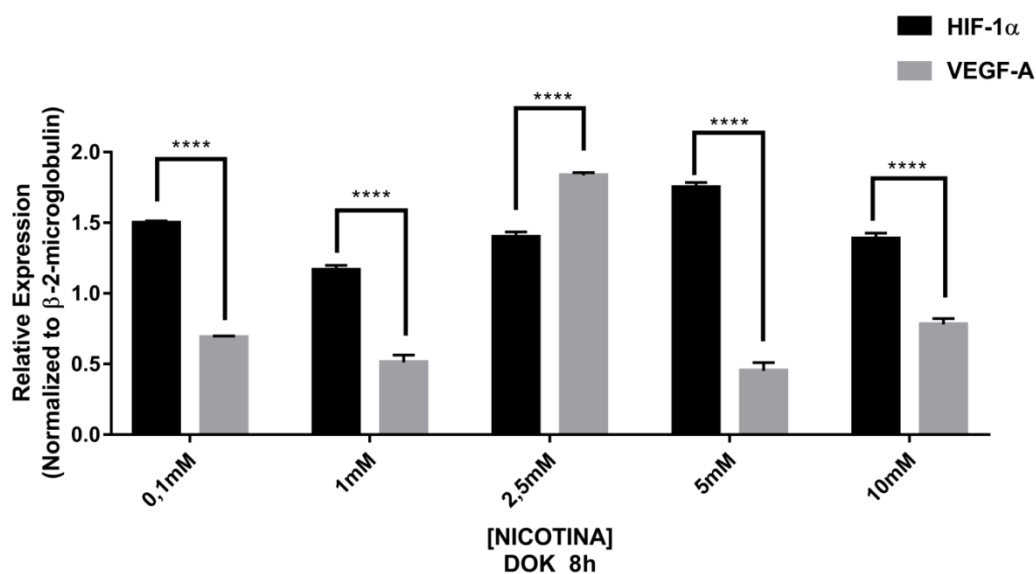


Figura 14. Expressão do gene VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK. (A) Análise da expressão de VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK por 8 h e (B) por 24 h. **** Diferem significativamente do grupo controle (Câmara de hipóxia) ($p < 0,0001$), ● Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,0001$), ○ Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,001$), Δ Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,05$), & Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,0001$), ♦ Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,001$), \$\$ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,0001$), ## Diferem significativamente de 1 mM ($p < 0,01$), # Diferem significativamente de 1 mM ($p < 0,05$). O número relativo de transcritos de VEGF-A foi normalizado em relação ao gene endógeno β-2-microglobulina (B2M) e analisados através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média ± desvio padrão.

A figura 15 mostra a correlação entre a expressão de HIF-1α e VEGF-A, e neste observa-se um padrão diferente do observado na linhagem SCC-9, na qual, pode-se observar no tratamento 2,5 mM/8h e 10 mM/24h uma maior expressão de VEGF-A em comparação à HIF-1α.

A



B

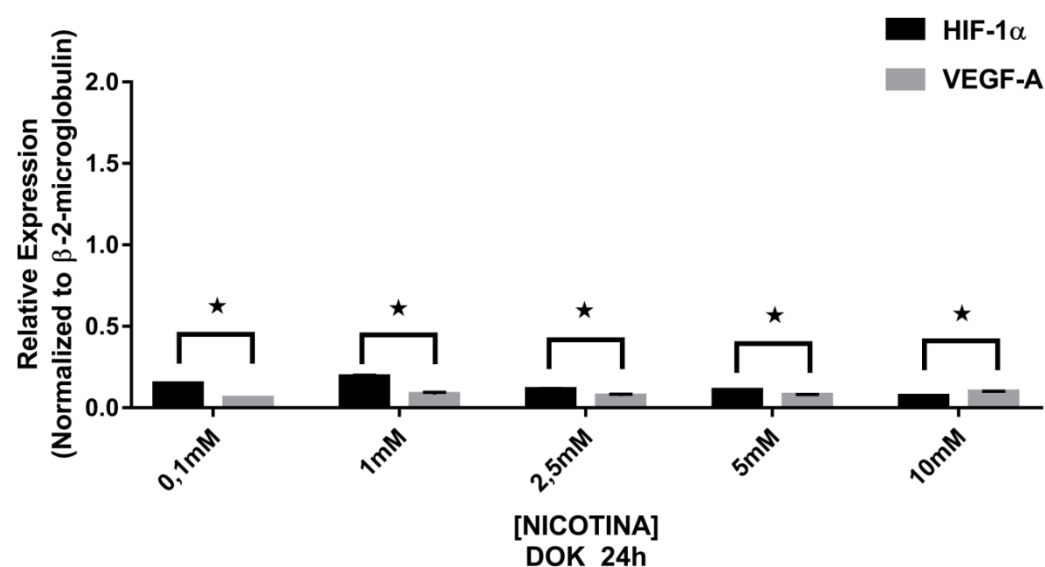


Figura 15. Ativação de HIF-1 α e expressão de VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK. (A) Ativação de HIF-1 α e expressão de VEGF-A após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK por 8h e **(B)** por 24h. **** Após 8h de exposição, na concentração 0,1 mM e 5 mM VEGF-A diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,0001$); em 1 mM, 2,5 mM e 10 mM VEGF-A diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,001$). ★ Após 24h de exposição, a concentração 0,1 mM VEGF-A difere significativamente de HIF-1 α ($p < 0,0001$); em 1 mM VEGF-A difere significativamente de HIF-1 α ($p < 0,001$); em 2,5 mM, 5 mM e 10 mM VEGF-A diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,01$). O número relativo de transcritos dos genes HIF-1 α e VEGF-A foram normalizados em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisados através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.

O perfil de expressão do gene FIH para a linhagem DOK variou entre os tempos de 8 e 24h. Em relação aos tratamentos aplicados por 8h pode-se observar que 0,1 mM e 2,5 mM mostraram níveis similares de expressão em relação às células em hipóxia (Figura 16A). Já o tempo de 24h pode-se observar uma diminuição na expressão em todos os tratamentos (Figura 16B). Além disso, houve diferença significativa entre os tratamentos de 8 h e 24 h quando comparados entre si ($p<0,05$).

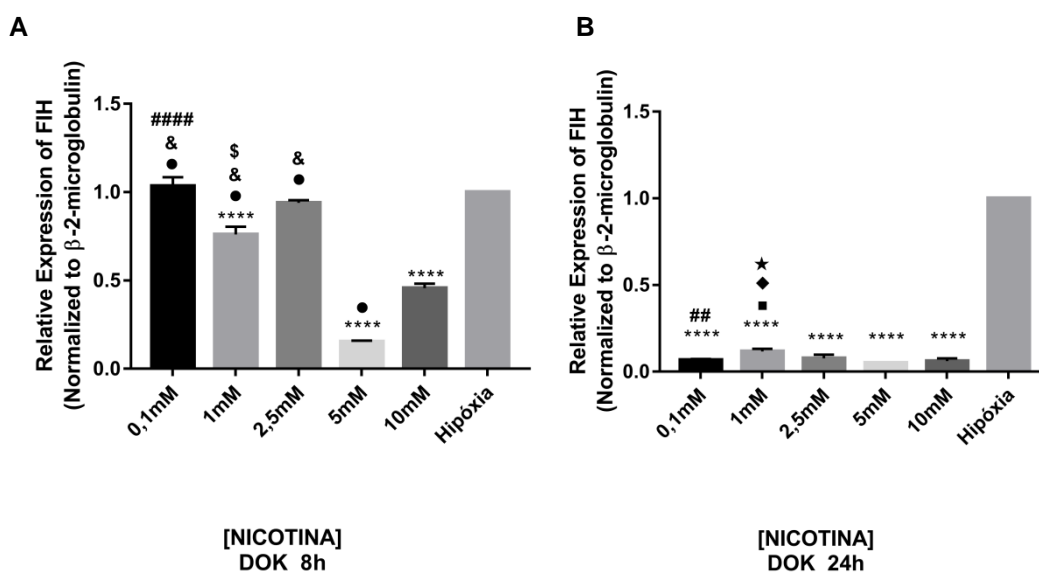


Figura 16. Expressão do gene FIH após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK. (A) Análise da expressão de FIH após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK por 8 h e (B) por 24 h. **** Diferem significativamente do grupo controle (Câmara de hipóxia), **•** Diferem significativamente de 10 mM, **■** Diferem significativamente de 10 mM, **&** Diferem significativamente de 5 mM ($p<0,0001$), **♦** Diferem significativamente de 5 mM ($p<0,001$), **\$** Diferem significativamente de 2,5 mM ($p<0,001$), **★** Diferem significativamente de 2,5 mM ($p<0,05$), **#####** Diferem significativamente de 1 mM ($p<0,0001$), **##** Diferem significativamente de 1 mM ($p<0,01$). O número relativo de transcritos de FIH foi normalizado em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisado através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.

Em relação a PHD3, este se manteve com uma baixa expressão, assim como observado para a linhagem SCC-9. Pode-se observar que todos os tratamentos tiveram uma menor expressão quando comparados a hipóxia (Figura 17A e B), no entanto, mesmo com a baixa expressão observou-se uma diferença significativa entre os tratamentos de 8 h e 24 h comparados entre si ($p<0,05$).

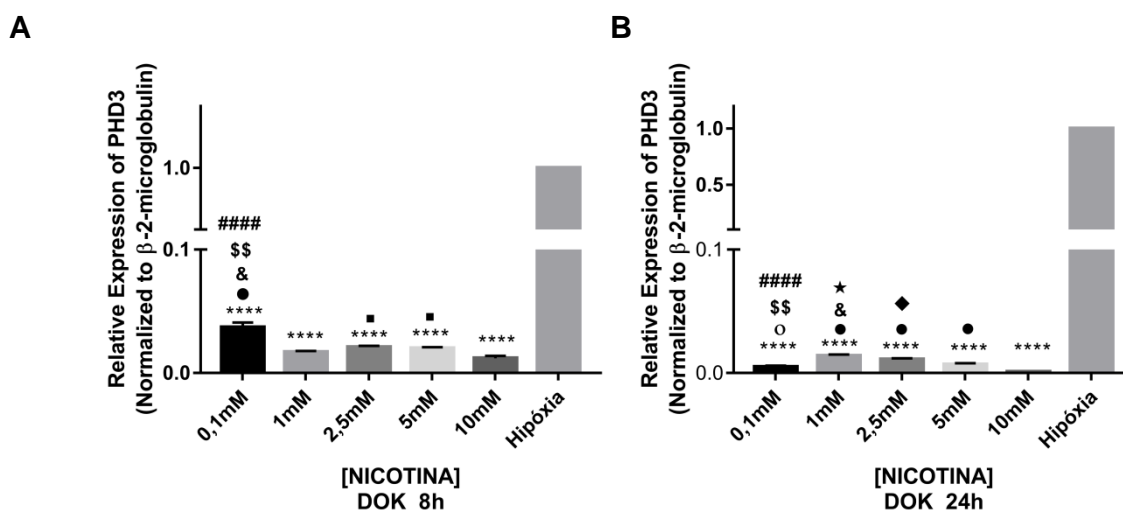
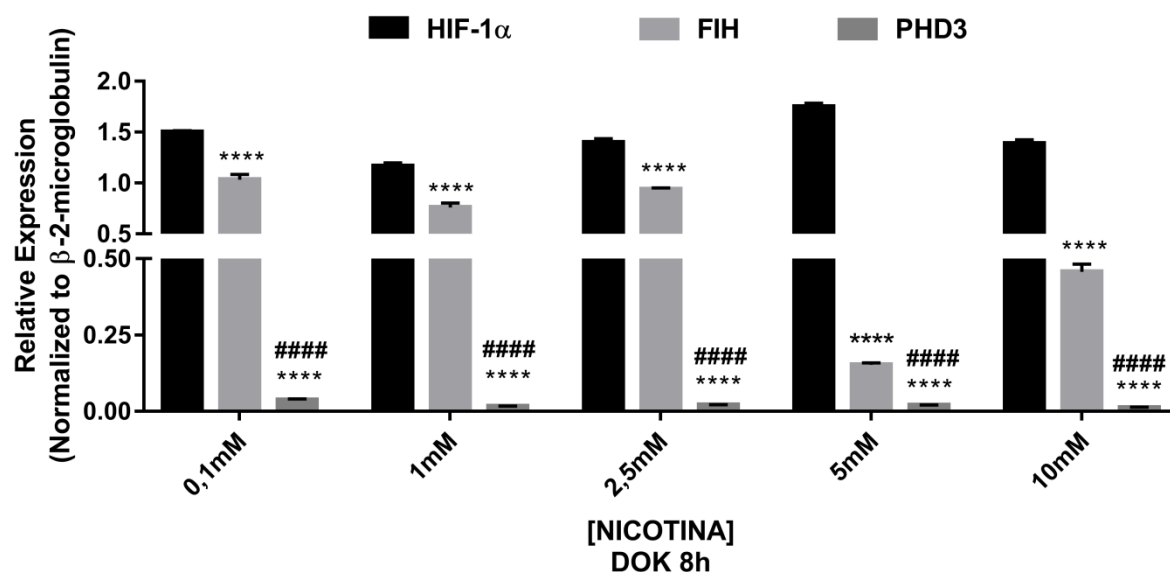


Figura 17. Expressão do gene PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK. (A) Análise da expressão de PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK por 8 h e (B) por 24 h. **** Diferem significativamente do grupo controle (Câmara de hipóxia) ($p < 0,0001$), • Diferem significativamente de 10 mM através de Teste Tukey ($p < 0,0001$), ○ Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,001$), ■ Diferem significativamente de 10 mM ($p < 0,01$), & Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,0001$), ♦ Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,001$), ♂♂ Diferem significativamente de 5 mM ($p < 0,01$), \$\$ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,0001$), ★ Diferem significativamente de 2,5 mM ($p < 0,05$), ##### Diferem significativamente de 1 mM ($p < 0,0001$). O número relativo de transcritos de PHD3 foi normalizado em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisados através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.

Por fim, o perfil de expressão analisado para estes genes nas células DOK, segue o mesmo padrão observado para as células SCC-9, observando-se uma maior expressão de FIH em comparação à PHD3 (Figura 18), o que fortalece a hipótese de que a regulação gênica para HIF-1 α quando exposta à nicotina esta diretamente ligada a ativação da via de regulação promovida por FIH.

A



B

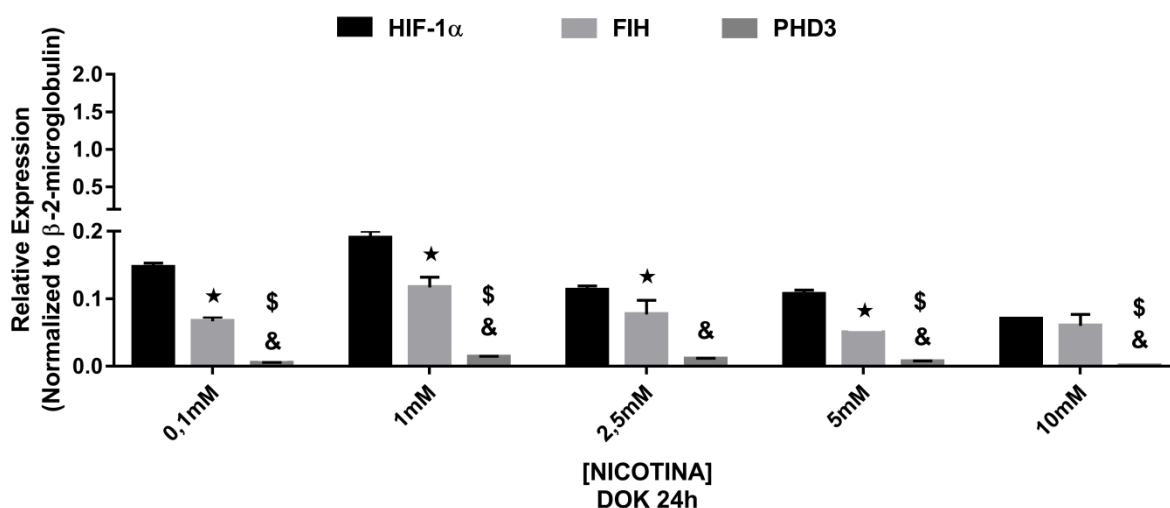


Figura 18. Ativação de HIF-1 α e regulação promovida em FIH e PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular DOK. (A) Ativação de HIF-1 α e regulação promovida em FIH e PHD3 após exposição com Nicotina em linhagem celular SCC9 POR 8h e **(B)** por 24h. **** Após 8h de exposição às concentrações 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM e 10 mM diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,0001$). #### às concentrações 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM e 10 mM diferem significativamente de FIH ($p < 0,0001$); a concentração 5 mM difere significativamente de FIH ($p < 0,001$). ★ Após 24h de exposição às concentrações 0,1 mM e 5 mM em FIH diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,0001$); a concentrações 1 mM em FIH diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,01$); a concentrações 2,5 mM em FIH diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,05$). & às concentrações 0,1 mM, 1 mM e 5 mM em PHD3 diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,0001$); às concentrações 2,5 mM e 10 em PHD3 diferem significativamente de HIF-1 α ($p < 0,001$). \$ às concentrações 0,1 mM e 5 mM diferem significativamente de FIH ($p < 0,0001$); às concentrações 1 mM e 10 mM diferem significativamente de FIH ($p < 0,001$); a concentração 2,5 mM difere significativamente de FIH ($p < 0,01$). O número relativo de transcritos dos genes HIF-1 α , FIH E PHD3 foram normalizados em relação ao gene endógeno β -2-microglobulina (B2M) e analisados através de teste Tukey. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

5.1 VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS SCC-9 E DOK INCUBADAS COM NICOTINA

O consumo de tabaco é um fator de risco em destaque para o desenvolvimento de um grande número de doenças, e os componentes do cigarro são constantes objetos de estudo cuja finalidade é compreender os efeitos adversos do tabagismo sobre o comportamento biológico ou na resposta ao tratamento de inúmeras doenças (SINGH et al., 2011).

Células que compõem a mucosa oral estão expostas de forma direta aos componentes do tabaco. Desta forma, estudos que têm por objetivo analisar os mecanismos advindos da exposição do tabaco são essenciais para a elucidação dos mecanismos relacionados à carcinogênese ou a viabilidade.

Este trabalho analisou por meio de MTS a influência da nicotina na viabilidade celular das linhagens SCC-9 e DOK, a fim de observar o perfil proliferativo e estabelecer o limiar de tempo/concentração para as células e desta forma, estabelecer uma melhor correlação com os mecanismos celulares acionados *in vitro* e *in vivo* em relação à exposição à nicotina.

Neste estudo, pode-se observar que as diferentes concentrações de nicotina promoveram a proliferação celular na linhagem SCC-9, ressaltando-se as concentrações de 1 e 2,5 mM para o tempo de 8 horas. Este achado corrobora com o estudo de Salimi e colaboradores (2012) que observaram o aumento da viabilidade celular promovida pela exposição à nicotina em linhagem humana de células escamosas orais expostas por 6h. Shi e colaboradores (2012) também realizaram um estudo similar em linhagens de carcinoma da nasofaringe tratadas com baixas concentrações de nicotina por 72 horas, e observaram que nicotina promoveu

significativamente a proliferação celular de um modo dependente da concentração, resultando num aumento de 20-100% na viabilidade das células.

Diferente do observado, em 8 horas, a permanência da linhagem SCC-9 incubadas com nicotina por 24 horas não garantiu aumento da viabilidade para as concentrações de 0,1 a 10 mM, no entanto, não foi observada uma redução significativa da viabilidade nas mesmas concentrações. Lee e colaboradores (2005) relataram em seu estudo que em linhagens de tumor oral primário (HN4) e de tumor oral metastático (HN12) houve uma redução da viabilidade celular de forma dose-dependente, no entanto, estas mantiveram-se com viabilidade celular acima de 50% para as concentrações superiores a 0,1 mM no tempo de 24 horas. Sendo assim, pode-se sugerir que nicotina promova a proliferação celular em células SCC-9 de forma dose e tempo dependente, assim como é relatado na literatura.

Em relação à linhagem DOK, não foi observado diferença na viabilidade celular para o tempo de 8 horas. Diferente do observado em 8h, as células expostas por 24 horas apresentaram uma redução significativa nas concentrações de 2,5, 10, 20 e 30 mM. O estudo realizado por Martinez e colaboradores (2002) observaram em culturas de Fibroblastos expostas a diferentes concentrações de nicotina a redução na viabilidade celular e modificações na morfologia das células de forma dose/tempo-dependente.

Em geral, estes dados sugerem que existe diferença na viabilidade celular observada para as linhagens SCC-9 e DOK e, esta pode estar correlacionada com as interações entre a nicotina e os metabolitos celulares, as diferenças celulares que caracterizam as linhagens e no nível de sensibilidade celular na presença de nicotina. Nesse sentido, Lee e colaboradores (2005) relataram que as linhagens tumorais apresentaram uma menor sensibilidade à presença de nicotina em comparação as linhagens de queratinócitos orais.

Neste estudo, também foi possível observar que as concentrações de 20 e 30 mM apresentaram os menores índices de viabilidade celular para os dois tipos celulares nos tempos de 8 e 24h. Este achado pode ser justificado pelo mecanismo celular lento de eliminação de nicotina, sendo assim, a exposição prolongada e em altas concentrações podem resultar em uma toxicidade intracelular com possíveis

alterações celulares (HANES et al., 1991). Deve-se ressaltar que neste estudo também foram testadas concentrações 40 a 100 mM, e nestas não foi possível observar viabilidade celular.

Em relação às doses de nicotina utilizadas no trabalho, é válido ressaltar que estas cumprem o objetivo de alcançar a alta concentração de exposição para as células da mucosa oral de indivíduos fumantes. Assim, justifica-se o modelo de administração de altas doses de nicotina utilizado no presente estudo.

5.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DE HIF-1A, VEGF-A, FIH E PHD3 EM LINHAGENS CELULARES SCC-9 E DOK

O hábito tabagista é uma doença crônica causada pela dependência nicotínica, e desempenha um papel importante nas respostas celulares e no surgimento de novas doenças, entre estas o câncer (GRANDO, 2014). Entre os componentes do tabaco, a nicotina pode ter um importante papel no processo de carcinogênese em indivíduos tabagistas, e o seu mecanismo de ação pode promover a modulação da atividade de várias proteínas celulares relacionadas com os mecanismos de sobrevivência, proliferação e angiogênese (CZYŻYKOWSKI et al., 2016).

Pesquisas recentes apontam HIF-1 α como um importante biomarcador de prognóstico, devido a sua correlação com a resposta a radiação observada *in vivo* por meio da sinalização parácrina entre tumores e os vasos que compõem o estroma (SCHWARTZ et al., 2011; MENDES et al., 2014). Neste sentido, a expressão observada para este marcador pode ser significativamente alterada em indivíduos tabagistas, o que dificulta a qualificação destes no auxílio do diagnóstico, do prognóstico, e no planejamento terapêutico (COLOMBO, RAHAL, 2009).

A expressão gênica de HIF-1 α também está diretamente relacionada a mecanismos de resposta celular ao estresse hipóxico. Neste trabalho foi possível observar que nicotina induziu a expressão de HIF-1 α em células SCC-9 e DOK de forma dose-dependente no tempo de 8h, destacando-se a concentração de 0,1 mM que teve uma expressão 2,5-vezes mais elevada do que a observada nas células hipóxicas. Em relação à DOK, as concentrações de destaque foram de 0,1 e 5 mM, que tiveram uma expressão 1,5-vezes e 1,8-vezes, respectivamente, maiores quando comparados à células hipóxicas. Kim e colaboradores (2012) também observaram um aumento da expressão de HIF-1 α em células do ligamento periodontal de humanos tratadas com nicotina, no entanto, esta foi de forma tempo-dependente, sendo fixado a concentração de 5 mM para dar sequência aos experimentos.

Outros autores como: Zhang e colaboradores (2007), Warren e colaboradores (2012) e Ma e colaboradores (2014), também relataram a modulação e aumento da expressão de HIF-1 α de forma concentração-dependente em linhagens de adenocarcinoma de pulmão (A549), no entanto, estes trabalhos priorizaram os resultados de expressão proteica para estabelecer as demais correlações em estudo. Ainda neste sentido, Daijo e colaboradores (2016) descreveram que a expressão gênica de HIF-1 α foi modulada mediante a exposição a um extrato de fumaça de cigarro e por baixas concentrações de nicotina em linhagens A549.

Em relação à expressão gênica de HIF-1 α após 24h de exposição à nicotina para SCC-9, pode-se observar que a concentração mais relevante foi a de 0,1 mM que obteve uma expressão 5,1-vezes mais elevada em comparação as células hipóxicas. As demais concentrações tiveram uma menor expressão do gene de forma significativa ($p < 0,0001$) quando comparadas as células hipóxicas e a concentração de 0,1 mM. A linhagem DOK, assim como SCC-9, teve uma redução da expressão gênica de HIF-1 α /24h em todas as concentrações.

A redução na expressão gênica de HIF-1 α pode estar ligada ao seu padrão de expressão reversível. Daijo e colaboradores (2016), relataram que indivíduos tabagistas estão suscetíveis a indução contínua de proteína HIF-1 α e de seus transcritos, no entanto, esta observação não é diretamente proporcional ao aumento da expressão gênica deste gene. Este indício também foi relatado por Warren e colaboradores (2012), que observaram picos de expressão de HIF-1 α seguidos da

redução a níveis basais de acordo com a dose aplicada e o tempo de exposição. Para uma melhor correlação destes indícios com o observado neste trabalho, faz-se necessário novas avaliações com concentrações intermediárias de nicotina e maior variação nos tempos de exposição.

O VEGF-A é um importante marcador de progressão tumoral devido a sua participação na formação de novos vasos, bem como na promoção a proliferação e migração das células endoteliais (DVORAK et al., 1995; KO et al., 2015). Neste estudo, a expressão gênica de VEGF-A também foi testada em linhagens SCC-9 e DOK por tempos variáveis. Foi observado no tempo de 8h uma maior expressão gênica em 1 mM seguido das concentrações 0,1 e 5 mM para SCC-9. Em relação à linhagem DOK, a expressão gênica também variou mediante a concentração, destacando-se a concentração de 2,5 mM, com uma expressão superior em 1,8-vezes.

Salimi e colaboradores (2012) observaram que em células escamosas orais humanas (BHY) incubadas com 0,2 mM de nicotina houve um aumento em 4 vezes na expressão gênica de VEGF-A em comparação com o grupo sem exposição. Shi e colaboradores (2012) e Ko e colaboradores (2015), também relataram o aumento da expressão de VEGF-A em carcinoma de epitélio escamoso da nasofaringe e em carcinoma oral de células escamosas, respectivamente, incubadas com baixa concentração de nicotina.

No tempo de 24h, a expressão gênica de VEGF-A foi inferior a observada para as células em hipóxia na linhagem SCC-9, e o mesmo padrão foi observado na linhagem DOK. Diferente do observado nesse estudo, Shi e colaboradores (2012) observaram a maior expressão gênica e proteica de VEGF-A em carcinoma de epitélio escamoso diferenciado nasofaríngeo na concentração de 0,1 mM de nicotina por 24h, e a comparação entre esses resultados garantem que as características celulares podem ser quesitos importantes que influenciam a expressão deste gene.

A expressão da proteína HIF-1 α conduz a ativação de vários genes de resposta a jusante à hipóxia, nesse sentido, estabelecer a correlação entre a expressão de HIF-1 α e VEGF-A é essencial para se concluir se a modulação da via de hipóxia promovida por nicotina atua como única via de promoção para a expressão gênica

de VEGF-A. Observamos na linhagem SCC-9 que a expressão gênica de VEGF-A segue um padrão dependente de HIF-1 α para todas as concentrações e tempo de estudo. Também foi possível observar a mesma correlação na linhagem DOK, observando desvios apenas nas concentrações 2,5 mM/8h e 10 mM/24h.

Estudos já citados neste trabalho como o de Zhang e colaboradores (2007), Ma e colaboradores (2014) e Daijo e colaboradores (2016), também relataram que HIF-1 α está diretamente envolvido na expressão de VEGF-A induzida pela nicotina. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que HIF-1 α contribui, pelo menos em parte, para a expressão de VEGF-A sob indução de nicotina.

A atividade do complexo HIF-1 pode ser controlada por dois mecanismos. O primeiro realizado pela PHD3, consiste da hidroxilação do resíduo prolina na HIF-1 α , que resulta na ligação da proteína *von Hippel-Lindau* tumor supressor (VHL) e consequente ubiquitinação e degradação proteassomal. O segundo, realizado por FIH, baseia-se na hidroxilação de um resíduo aspargina que previne a interação de HIF-1 α com seu coativador de transcrição CBP/p300 (RANKIN; GIACCIA, 2008).

Neste trabalho, a expressão gênica de FIH para a linhagem SCC-9 exposta por 8h não foram significativas, destacando-se apenas a concentração de 1 mM, na qual, foi observada a mesma expressão de células expostas a hipóxia. O mesmo foi observado na linhagem DOK para o tempo de 8h, destacando-se as concentrações de 0,1 e 2,5 mM. Para o tempo de 24h, destacou-se a concentração de 0,1 mM para células SCC-9, sendo apresentado um aumento de 1,9-vezes na expressão do gene em comparação as células em hipóxia.

Não é descrito na literatura a possível correlação entre nicotina e a expressão gênica de FIH, no entanto, vários estudos tentam estabelecer como se dá a ação de FIH em condições hipóxicas. Mahon e colaboradores (2001), relataram uma sobre-expressão de FIH em células Hep3B de hepatoblastoma humano submetidas à hipóxia, postulando-se que existe a possibilidade de que a interação entre HIF-1 α e FIH não seja regulada apenas pela concentração de O₂. O comparativo entre esta afirmação e o observado neste estudo mostrou que nicotina pode estar relacionada com a baixa expressão gênica de FIH de forma tempo-dependente, e para que a

hipótese seja confirmada, faz-se necessário mais estudos que envolvam a via de regulação promovida por FIH mediante a incubação com nicotina.

Em relação a PHD3, foi observada a baixa expressão gênica de PHD3 em todas as concentrações quando comparado a células em hipóxia. A baixa expressão de PHD3 modulada pela nicotina pode estar ligada ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) que estimulam a tradução de proteínas HIF-1 α por meio da modificação na atividade das PHDs (DEWHIRST et al., 2008; GALANIS et al., 2008). Neste sentido, Daijo e colaboradores (2016) observaram em seus estudos que a ativação de HIF-1 α e dos transcritos era dependente de ROS em tecidos pulmonares de camundongos de forma dose e tempo dependente.

Guo e colaboradores (2012) também descreveram que a exposição a nicotina estimulou a geração de ROS mitocondrial, e este pode imitar os efeitos da hipóxia por meio da estabilização da proteína HIF-1 α . Somados todos os achados, acredita-se que além dos efeitos fisiopatológicos relacionados à nicotina descritos na literatura, ela atua como inibidora da cadeia respiratória mitocondrial, o que resulta no aumento da produção de radicais livres devido ao vazamento de elétrons do complexo respiratório (BELL et al., 2005).

Diante do exposto, não é possível estabelecer uma correlação entre a exposição à nicotina e a expressão gênica de FIH e PHD3, já que, os genes parecem ser modulados por mecanismos distintos.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, as análises da viabilidade celular e de expressão gênica de HIF1 α , VEGF-A, FIH e PHD3 foram efetuadas por meio de MTS e RT-qPCR, respectivamente, com o intuito de observar o efeito da nicotina sobre a viabilidade celular e na expressão gênica destes genes. Diante dos resultados, conclui-se que:

- A nicotina promove a proliferação celular na linhagem SCC-9 de forma dose e tempo dependente, no entanto, os mesmos resultados não foram observados para a linhagem DOK, o que demonstra que possivelmente os diferentes resultados estejam ligados às características celulares das linhagens. Entre as concentrações de nicotina, observou-se que as células têm uma drástica queda na viabilidade a partir de 20 mM;
- Em relação à expressão gênica, observou-se que nicotina induz a expressão de HIF-1 α em células SCC-9 e DOK de forma dose e tempo dependente, e que a expressão gênica de HIF-1 α contribui, pelo menos em parte, para a expressão de VEGF-A sob indução de nicotina. Também foi possível concluir que nicotina tem um alto potencial inibitório na expressão gênica dos genes FIH e PHD3 que regulam a via de hipóxia, e que ambos podem ser regulados de formas distintas.
- A Nicotina tem um papel de regulação na via de hipóxia que contribui para adesão celular, invasão, migração e metástase. Sendo assim, a correlação entre o observado neste trabalho com o descrito na literatura sugere que o hábito tabagista ou a direta exposição à nicotina podem estar relacionados com as possíveis respostas ao tratamento em pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral.

7 REFERÊNCIAS

- ADRIAN, C. L.; OLIN, H. B. D.; DALHOFF, K.; JACOBSEN, J. In vivo human buccal permeability of nicotine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.311, p. 196–202, 2006.
- ALMEIDA, A. A.; BANDEIRA, C. M.; GONÇALVES, A. J.; ARAÚJO, A. J. Nicotine dependence and smoking habits in patients with head and neck cancer. **The Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.40, n.3, p.286-293, 2014.
- ALVARENGA, L. M.; TORREGLOSA, R. M.; PAVARINO-BERTELLI, E. C.; RUBACK, M. J. C.; MANIGLIA, J. V.; BERTOLLO-MARIA, G. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 1, 2008.
- BARR, J.; SHARMA, C. S.; SARKAR, S.; WISE, K.; DONG, L.; PERIYAKARUPPAN, A.; RAMESH, G. T. Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 297, n. 1, p. 93–99, 2007.
- BELL, E. L.; EMERLING, B. M.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial regulation of oxygen sensing. **Mitochondrion**, v. 5, n.5, p. 322–332, 2005.
- BUSTAMANTE, F. L. S.; SOUZA, E. T.; LANZMASTER, M.; SCARPELLINI, M. Complexos ativados por hipóxia: uma estratégia para o combate ao câncer. **Revista Virtual Química**, v.1, n.2, p. 138-148, 2009.
- CARDOSO, J. V.; MACHADO, D. E. FERRARI, R.; SILVA, M. C.; BERARDO, P. T.; PERINI, J. A. Polimorfismos nos genes VEGF e KDR no desenvolvimento da endometriose: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 16, n. 3, p. 219-232, 2016 .
- CARLISLE, D. L.; LIU, X.; HOPKINS, T.M.; SWICK, M.C.; DHIR, R.; SIEGFRIED, J.M. Nicotine activates cell-signaling pathways through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung cancer cells. **The journal Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v.20, p.629-641, 2007.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v.473, 2011.
- CARROLL, V. A.; ASHCROFT, M. Role of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1A versus HIF-2A in the Regulation of HIF Target Genes in Response to Hypoxia, Insulin-Like

Growth Factor-I, or Loss of von Hippel-Lindau Function: Implications for Targeting the HIF Pathway. **Cancer Research**, v. 66, n.12, 2006.

CHEDID, H. M.; FRANZI, S.A. AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA DE PACIENTES COM RECIDIVA LOCO-REGIONAL DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE BUCAL E OROFARINGE SUBMETIDOS A TRATAMENTO DE RESGATE. **AMB Revista da Associação Médica Brasileira**, v.54, n.2, p. 127-131, 2008.

CHEN, A.M.; CHEN, L.M.; VAUGHAN, A.; SREERAMAN, R.; FARWELL, D. G.; LUU, Q. LAU, D. H.; STUART, K.; PURDY, J. A.; VIJAYAKUMAR, S. Tobacco smoking during radiation therapy for head-and-neck cancer is associated with unfavorable outcome. **International Journal of Radiation Oncology**, v. 79, n.2, p.414-419, 2011.

CHEN, H.; COSTA, M. Iron- and 2-oxoglutarate-dependent Dioxygenases: an emerging group of molecular targets for nickel toxicity and carcinogenicity. **Biometals**, v.22, p.191-196, 2009.

CHINTALA, S.; NAJRANA, T.; TOTH, K.; CAO, S.; DURRANI, F. A.; PILI, R.; RUSTUM, Y. M. Prolyl hydroxylase 2 dependent and Von-Hippel-Lindau independent degradation of Hypoxia-inducible factor 1 and 2 alpha by selenium in clear cell renal cell carcinoma leads to tumor growth inhibition. **BMC Cancer**, v.12, n. 293, 2012.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Genetic Changes in Head and Neck Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55, n. 2, p.165-174, 2009.

CONICQ, Convenção-Quadro na Assembleia Mundial da Saúde. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/observatorio_controle_tabaco/site/home/conicq/comissao>. Acesso em: 25/12/2016.

CURADO, M. P.; HASHIBE, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. **Current Opinion in Oncology**, v.21, n.3, p.194-200, 2009.

CZYŻYKOWSKI, R.; POŁOWINCZAK-PRZYBYŁEK, J.; POTEMSKI, P. Nicotine-induced resistance of non-small cell lung cancer to treatment – possible mechanisms. **Postepy Hig Med Dosw**, n. 70, p.186-193, 2016.

DAIJO, H.; HOSHINO, Y.; KAI, S.; SUZUKI, K.; NISHI, K.; MATSUO, Y.; HARADA, H.; HIROTA, K. Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen speciesdependent manner. **Scientific Reports**, v.29, n.6, 2016.

DEWHIRST, M.W.; CAO, Y.; MOELLER, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. **Nature Reviews**, v.8, n.6, p.425–437, 2008.

DVORAK, H.F.; BROWN, L.F.; DETMAR, M.; DVORAK, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 146, p.1029-1039, 1995.

ECKERT, A. W.; KAPPLER, M.; SCHUBERT, J.; TAUBERT, H. Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Maxillofac Surg**, v. 16, p.189–196, 2012.

FRESQUEZ, M. R.; PAPPAS, R. S.; WATSON, C. H. Establishment of Toxic Metal Reference Range in Tobacco from US Cigarettes. **Journal of Analytical Toxicology**, v.1, p.1–7, 2013.

GALANIS, A.; PAPPA, A.; GIANNAKAKIS, A.; LANITIS, E.; DANGAJ, D.; SANDALTZOPOULOS, R. Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer. **Cancer Letters**, v. 266, n.1, p.12-20, 2008.

GRANDO, S. A. Connections of nicotine to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.4, p.419–429, 2014.

GUO, L.; LI, L.; WANG, W.; PAN, Z.; ZHOU, Q.; WU, Z. Mitochondrial reactive oxygen species mediates nicotine-induced hypoxia-inducible factor-1 α expression in human non-small cell lung cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822, p.852–861, 2012.

HANES, P.J.; SCHUSTER, G.S.; LUBAS, S. Binding, uptake and release of nicotine by human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontology**, v. 62, n. 2 , p.147-152, 1991.

HEWITSON, K. S.; MCNEILL, L. A.; RIORDAN, M. V.; TIAN, Y.; BULLOCK, A. N.; WELFORD, R. W.; ELKINS, J. M.; OLDHAM, N. J.; BHATTACHARYA, S.; GLEADLE, J. M.; RATCLIFFE, P. J.; PUGH, C. W.; SCHOFIELD, C. J. Hypoxia-inducible Factor (HIF) Asparagine Hydroxylase Is Identical to Factor Inhibiting HIF (FIH) and Is Related to the Cupin Structural Family. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 277, n. 29, p. 26351–26355, 2002.

HSU, H.W.; WALL, N.R.; HSUEH, C.T.; KIMG, S.; FERRIS, R.L.; CHEN, C.S.; MIRSHAHIDI, S. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers. **Oral Oncology**, v.50, p.19-26, 2014.

INCA. Estimativa 2016: **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016.

INCA. PREVALÊNCIA DE TABAGISMO. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/observatorio_controle_tabaco/site/home/dados_numeros/prevalencia-de-tabagismo>. Acesso em: 03/01/2017.

JOHNSON, R.B.; SERIO, F.G.; DAI, X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. **Journal of Periodontology**, v.70, p.848-852, 1999.

KAELIN, W. G. J. R.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. **Molecular Cell**, v.30, p.393–402, 2008.

KIM, Y. S.; SHIN, S.I.; KANG, K.L.; CHUNG, J. H.; HERR, Y.; BAE, W. J.; KIM, E. C. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the production of MMPs and prostaglandin E2 by hypoxia-inducible factor-1a up-regulation in human periodontal ligament cells. **JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH**, v.47, p.719–728, 2012.

KISHIMOTO, K.; YOSHIDA, S.; IBARAGI, S.; YOSHIOKA, N.; OKUI, T.; HU, G.; SASAK, A. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer. **Oral Oncology**, v.48, p.1120-1127, 2012.

KO, H.; LEE, J.; CHEN, H.; KOK, S.; KUO, M. Y.; CHENG, S.; CHIANG, C. Upregulation of vascular endothelial growth factor mRNA level is significantly related to progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas. **Journal of the Formosan Medical Association**, v.114, n.7, p.605-611, 2015.

LEE, H.; GUO, H.; LEE, S.; JEON, B.; JUN, C.; LEE, S.; PARK, M.; KIM, E. Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.34, p.436–443, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) **method**. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.

MA, X.; JIA, Y.; ZU, S.; LI, R.; JIA, Y.; ZHAO, Y.; XIAO, D.; DANG, N.; WANG, Y. Alpha5 nicotinic acetylcholine receptor mediates nicotine-induced HIF-1 α and VEGF expression in non-small cell lung cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.278, p.172–179, 2014.

MAHONM, P. C.; HIROTA, K.; SEMENZA, G.L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. **GENES & DEVELOPMENT**, v.15:p.2675–2686, 2001.

MARTINEZ, A. E.; SILVÉRIO, K. G.; JÚNIOR, C. R. Effect of nicotine on the viability and morphology of fibroblasts – *in vitro* study. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.16, n.3, p.234-238, 2002.

MEDICINANET. Disponível em www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/4493/cancer_de_cabeca_e_pescoco.htm. Acesso em: 23 jun. 2014.

MENDES, S. O.; SANTOS, M.; PETERLE, G. T.; MAIA, L. L.; STUR, E.; AGOSTINI, L. P.; DE CARVALHO, M. B.; TAJARA, E.H.; LOURO, I. D.; TRIVILIN, L. O.; DA SILVA-CONFORTI, A. M. Á. . HIF-1alpha Expression Profile in Intratumoral and Peritumoral Inflammatory Cells as a Prognostic Marker for Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. **Plos One**, v. 9, p. e84923, 2014.

MISHRA, A.; CHATURVEDI, P.; DATTA, S.; SINUKUMAR, S.; JOSHI, P.; GARG, A. Harmful effects of nicotine. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, v.36, n.1, p. 24–31, 2015.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v.25, n.6, 2002.

OMS. Global status report on noncommunicable diseases 2010: Description of the global burden of NCDs, their risk factors and determinants. Switzerland: World Health Organization, 2010.

PINTO, F.R.; MATOS, L.L.; GUMZ-SEGUNDO, W.; VANNI, C.M.; ROSA, D.S.; KANDA, J. L. Tobacco and alcohol use after head and neck cancer treatment: influence of the type of oncological treatment employed. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.57, n.2, p.171-176, 2011.

PRADEEP, A. R.; PRAPULLA, D. V.; SHARMA, A.; SUJATHA, P.B. Gingival crevicular fluid and serum vascular endothelial growth factor: their relationship in periodontal health, disease and after treatment. **Cytokine**, v.54, p.200-204, 2011.

RANKIN, E.B.; GIACCIA, A.J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. **Cell Death Differ**, v.15, p.678-685, 2008.

ROSE, J.E.; LEVIN, E.D.; BENOWITZ, N. Saliva nicotine as an index of plasma levels in nicotine skin patch users. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.15, p.431–435, 1993.

SALIMI, M.; ESFAHANI, M.; HABIBZADEH, N.; ASLANI, H. R.; AMANZADEH, A.; ESFANDIARY, M.; SEDAGHATI, B.; BIDGOLI, S. A.; GHAHREMANI, M. H. CHANGE in Nicotine-Induced VEGF, PGE2 AND COX-2 Expression Following COX Inhibition in Human Oral Squamous Cancer. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.31, n.4, p.349-356, 2012.

SALNIKOW, K.; ZHITKOVICH, A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis nickel, arsenic and chromium. **Chemical Research in Toxicology**, v.21, p.28-44, 2008.

SANNER, T.; GRIMSRUD, T. K. Nicotine: carcinogenicity and effects on response to cancer treatment – a review. **Frontiers in Oncology**, v.5, 2015.

SANTOS, M.; MERCANTE, A. M. C.; LOURO, I. D.; GONÇALVES, A. J.; CARVALHO, M. B.; SILVA, E. H. T.; SILVA, A. M. A. HIF1-Alpha expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Plos One**, v. 2, p. 1-7, 2012.

SCHWARTZ, D.L.; BANKSON, J.; BIDAUT, L.; HE, Y.; WILLIAMS, R.; LEMOS, R.; THITAI, A. K.; OH, J.; VOLGIN, A.; SOGHOMONYAN, S.; YEH, H. H.; NISHII, R.; MUKHOPADHAY, U.; ALAUDDIN, M.; MUSHKUDIANI, I.; KUNO, N.; KRISHNAN, S.; BORNMAN, W.; LAI, S. Y.; POWIS, G.; HAZLE, J.; GELOVANI, J. HIF-1-dependent stromal adaptation to ischemia mediates in vivo tumor radiation resistance. **Molecular Cancer Research**, v.9, n.3, p.259-270, 2011.

SEMENZA, G. L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.15, p.551–578, 1999.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature**, v.3, n.10, p. 721-732, 2003.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. **Cell**, v. 148, n.3, p.399-408, 2012.

SHI, D.; GUO, W.; CHEN, W.; FU, L.; WANG, J.; TIAN, Y.; XIAO, X.; KANG, T.; HUANG, W.; DENG, W. Nicotine Promotes Proliferation of Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Regulating $\alpha 7$ AChR, ERK, HIF-1 α and VEGF/PEDF Signaling. **PLOS ONE**, v.7, n.8, 2012.

SINGH, S.; PILLAI, S.; CHELLAPPAN, S. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. **Journal of Oncology**, v.30, 2011.

STOLZE, I. P.; MOLE, D. R.; RATCLIFFE, P. J. Regulation of HIF: prolyl hydroxylases. **Novartis Found Symp**, v.272, p.15–25, 2006.

UICC. **TNM: Classification of Malignant Tumours**. USA: Wiley- Blackwell, 2009.

VILAR, C. M. C.; MARTINS, Í. M. Câncer de cabeça e pescoço. In: VIEIRA, S. C.; LUSTOSA, A. M. L.; BARBOSA, C. N. B.; TEIXEIRA, J. M. R.; BRITO, L. X. E.; SOARES, L. F. M.; FERREIRA, M. A. T. (Org.). *Oncologia Básica*. Oncologia Básica. 1ed. Teresina: Fundação Quixote, 2012, v.1, p. 09-21, 2012.

VINEIS, P.; ALAVANJA, M.; BUFFLER, P.; FONTHAM, E.; FRANCESCHI, S.; GAO, Y. T.; GUPTA, P. C.; HACKSHAW, A.; MATOS, E.; SAMET, J.; SITAS, F.; SMITH, J.; STAYNER, L.; STRAIF, K.; THUN, M. J.; WICHMANN, H. E.; WU, A. H.; ZARIDZE, D.; PETO, R.; DOLL, R. "Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence," **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 96, no. 2, p.99–106, 2004.

WARREN, G. W.; ROMANO, M.A.; KUDRIMOTI, M. R.; RANDALL, M. E.; MCGARRY, R. C.; SINGH, A. K. Nicotinic modulation of therapeutic response in vitro and in vivo. **The International Journal of Cancer**, v. 131, p.2519–2527, 2012.

WARREN, G. W.; SINGH, A.K. Nicotine and lung cancer. **Journal of Carcinogenesis**, v.12, n.1. 2013.

WEST, K. A.; BROGNARD, J.; CLARK, A. S.; LINNOILA, I. R.; YANG, X.; SWAIN, S.M.; HARRIS, C.; BELINSKY, S.; DENNIS, P. A. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v.111, n.1, p.81-90, 2003.

YANG, J.; LEDAKI, I.; TURLEY, H.; GATTER, K. C.; MONTERO, J. C. M.; LI, J. L.; HARRIS, A. L. Role of Hypoxia-Inducible Factors in Epigenetic Regulation via Histone Demethylases. *Hypoxia and Consequences: Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 11, n.77, p.185–197, 2009

YONG-SHI, H.; GANG-FANG, W. Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v.10, n.8, p.1082-1087, 2004.

ZHANG, Q.; TANG, X.; ZHANG, Z.; VELIKINA, R.; SHI, S.; LE, A. Nicotine Induces Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression in Human Lung Cancer Cells via Nicotinic Acetylcholine Receptor–Mediated Signaling Pathways. **Clinical Cancer Research**, v.13, n.16, p.4686–4694, 2007.